

Entwicklung einer Mikrochip-navigierten Zellsortieranlage

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften
Abteilung Elektrotechnik und Informationstechnik
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

genehmigte Dissertation

von

Stefan Kahnert

aus

Bottrop

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing Holger Vogt

2. Gutachter: Prof. Dr. sc. techn. Daniel Erni

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2016

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis.....	ix
Abkürzungsverzeichnis.....	x
Formelzeichen.....	xii
1 Einleitung.....	15
1.1 Problemstellung und Zielsetzung.....	15
1.2 Stand der Technik.....	17
1.2.1 Zell- und Partikelseparation mittels Electrowetting.....	17
1.2.2 Mikrofluidik-basierte Methoden zur Zell und Partikelseparation.....	20
1.2.3 Biomedizinische Anwendung von EWOD-Systemen.....	28
1.3 Fortschritt durch die Mikrochip-navigierte Zellsortierung.....	32
2 Grundlagen des Electrowettings.....	35
2.1 Kohäsions- und Adhäsionskräfte in Flüssigkeiten.....	35
2.2 Die Oberflächenspannung.....	40
2.2.1 Physikalisches Konzept der Oberflächenspannung.....	40
2.2.2 Molekulare Ursachen der Oberflächenspannung.....	42
2.2.3 Oberflächenspannung an gekrümmten Oberflächen.....	44
2.3 Die Oberflächenbenetzung.....	47
2.3.1 Kapillarität.....	47
2.3.2 Benetzung auf Festkörpern.....	49
2.3.3 Einfluss des elektrischen Potentials auf die Benetzung.....	50
2.4 Fluidoperationen in geschlossenen EWOD-Systemen.....	53
2.4.1 Druckverhältnisse in Flüssigkeitstropfen.....	53
2.4.2 Generieren, Transportieren, Teilen und Mischen diskreter Flüssigkeitstropfen.....	56
3 Konzept der Zellsortieranlage.....	58
3.1 Struktur des Sortieralgorithmus.....	59
3.2 Aufbau des Mikrochips.....	61
3.3 Konstruktion der Mikrofluidik.....	66
3.4 Ansteuerung und Nutzung des Mikrochips als Sortieranlage.....	69

4	Evaluiierung optischer Systeme	72
4.1	Abschätzung der Photoelektronenausbeute	72
4.2	Evaluiierung unterschiedlicher Messsysteme.....	76
5	Charakterisierung des Funktionsmusters 1.....	85
5.1	Nachweis relevanter Fluidoperationen.....	86
6	Prozessentwicklung und Aufbau des Zellsortier-Chips	90
6.1	Herstellung des Layouts und des Siliziumchips.....	91
6.2	Abscheidung des Dielektrikums.....	94
6.3	Freilegung der Kontaktpads und Kontrolle der Funktionalität	95
6.4	Herstellung des Spacers	98
6.4.1	Verarbeitung des Positiv-Fotolacks AZ 10XT als Spacer-Material....	99
6.4.2	Verarbeitung des Negativ-Fotolacks SU-8 als Spacer-Material	102
6.5	Hydrophobisierung der Chip-Oberfläche	107
6.6	Sägen und Drahtbonden der Chips	113
6.7	Justierung der Deckelelektrode und Verguss der Bonddrähte.....	113
6.8	Anschluss der Spannungsversorgung und der Ansteuerung.....	115
7	Charakterisierung des Zellsortier-Chips	118
7.1	Nachweis relevanter Fluidoperationen.....	118
7.2	Geschwindigkeitsmessungen anhand von Flüssigkeitstropfen	125
7.3	Bestimmung von Partikelverteilungen.....	129
7.4	Sortierexperiment anhand fluoreszierender Beads	133
7.5	Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe.....	137
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	140
9	Literaturangaben	143
	Veröffentlichungen	150
	Patente	152
	Abschlussarbeiten.....	153
	Danksagung.....	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Sequenz zur Trennung von negativ geladenen Latexpartikeln und ungeladenen Polystyrolpartikeln durch Elektrophorese..	18
Abbildung 1-2: Methode der negative Dielektrophorese (nDEP) Trennung biologischer Zellen	22
Abbildung 1-3: Zellsortierung durch akustische Wellen.....	23
Abbildung 2-1: Chemische Bindungen von Atomen oder Ionen	37
Abbildung 2-2: Modell bezüglich der mechanischen Betrachtung der Oberflächenspannung	40
Abbildung 2-3: Darstellung der anziehenden und abstoßenden Kräfte zwischen Molekülen in einer Flüssigkeit.....	43
Abbildung 2-4: Darstellung der durch die Grenzflächenspannung verursachten Kraft	46
Abbildung 2-5: Beschreibung der Druckverhältnisse innerhalb und außerhalb einer in eine Flüssigkeit getauchten Kapillare	47
Abbildung 2-6: Querschnitt eines sich auf einem Festkörper befindlichen Flüssigkeitstropfens.....	49
Abbildung 2-7: Darstellung eines EWOD-Systems	54
Abbildung 2-8: Darstellung aller relevanten Fluidoperationen	57
Abbildung 3-1: Modell des Siliziumchips inklusive des Elektrodenarrays	61
Abbildung 3-2: Schematische Zeichnung der Transportelektrode	62
Abbildung 3-3: Schematische Zeichnung der Reservoir- und der Generierelektroden	63
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Verlaufs der Leiterbahnen in unterschiedlichen Metallebenen.....	65
Abbildung 3-5: Querschnitt des Mikrochips	65
Abbildung 3-6: Querschnitt eines Elektrodenkontaktes.....	66
Abbildung 3-7: Modell des Siliziumchips inklusive eines SU-8 Spacers	67

Abbildung 3-8: Justiermarken zur Spacer Justierung.....	68
Abbildung 3-9: Zeichnung des Glasdeckels inklusive Verbindungsvorrichtungen	68
Abbildung 3-10: Prinzip der Ansteuerung des Funktionsmusters 2.....	70
Abbildung 3-11: Gehäuse mit Steuerplatinen und Darstellung der Chipträger- Platine	70
Abbildung 3-12: Ablauf-Diagramm eines Sortierzyklus.....	71
Abbildung 4-1: Abschätzung der Anzahl emittierter Photoelektronen durch die Fluoreszenzanregung.....	74
Abbildung 4-2: Mikroskop-Aufnahmen einer Verdünnungsreihe mit Rhodamin B-Partikeln	76
Abbildung 4-3: Messstände mit frequenzverdoppeltem Nd:Yag-Laser als Lichtquelle	78
Abbildung 4-4: Fluoreszenz-Zoom-Mikroskop mit einer Kamera und einer Quecksilberdampfampe als Anregungsquelle.....	79
Abbildung 4-5: Detektion von Rhodamin B-Partikeln in einer Mikrofluidik mit unterschiedlichen Lasersystemen.....	81
Abbildung 4-6: Aufnahme PE markierter Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop	82
Abbildung 4-7: Anregungsschema eines Fluoreszenzexperimentes mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren.....	84
Abbildung 5-1: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung des Funktionsmuster 1	86
Abbildung 5-2: Nachweis der Fluidoperationen Generieren, Transportieren und Teilen anhand des Funktionsmusters 1	87
Abbildung 5-3: Partikelhaltige Flüssigkeitstropfen a) vor und b) nach der Teilung.....	88
Abbildung 5-4: Beads bei eingeschalteter und inaktiver Spannung.....	89
Abbildung 6-1: Flussdiagramm des Herstellungsprozesses des EWOD-Chips...	90
Abbildung 6-2: Chiplayout und mikroskopische Aufnahme des gefertigten Siliziumchips.....	93

Abbildung 6-3: REM-Aufnahmen der Vias auf den Kontaktpads sowie der Leiterbahnen.....	93
Abbildung 6-4: REM-Aufnahme einer 100 nm dicken Ta ₂ O ₅ -Schicht.....	95
Abbildung 6-5: Kontaktpads vor und nach dem Ätzent	97
Abbildung 6-6: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Teststruktur des Mikrochips	98
Abbildung 6-7: Auftragung der Entwicklungstiefe in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität für Lackdicken.	100
Abbildung 6-8: Ansicht des Höhenprofils des Spacers	101
Abbildung 6-9: Mikroskop-Aufnahme eines abgeschiedenen Spacers.....	102
Abbildung 6-10: Darstellung des SU-8 Verarbeitungsprozesses	104
Abbildung 6-11: Mikroskop-Aufnahme der Justier-Strukturen des Spacers	105
Abbildung 6-12: Aufnahme des Spacers unter dem 3D-Mikroskop.	106
Abbildung 6-13: Aufnahme des gesamten Mikrochips	107
Abbildung 6-14: Kontaktwinkelmessungen auf unterschiedlichen PTFE-Oberflächen.....	109
Abbildung 6-15: Untersuchung unterschiedlicher Methoden zur PTFE-Entfernung.....	110
Abbildung 6-16: Maskierte Kontaktpads vor der PTFE-Abscheidung.....	111
Abbildung 6-17: REM-Aufnahme unterschiedlicher PTFE-Schichten	112
Abbildung 6-18: Abbildung eines aufgebauten EWOD-Moduls.....	115
Abbildung 6-19: EWOD-Modul unter dem Fluoreszenzmikroskop.....	117
Abbildung 7-1: Elektrodenschaltungssequenz einer Tropfengenerierung.....	119
Abbildung 7-2: Tropfengenerierung auf einem EWOD-Chip	121
Abbildung 7-3: Elektrodenschaltung einer Tropfenteilung	122
Abbildung 7-4: Tropfenteilung auf dem EWOD-Chip	124
Abbildung 7-5: Geschwindigkeitsmessungen des Tropfentransports.....	126
Abbildung 7-6: Teilung eines partikelhaltigen Tropfens.....	130
Abbildung 7-7: Partikelverteilung eines manuellen Teilungsexperimentes.....	131

Abbildung 7-8: Partikelverteilung eines automatisierten Teilungs- experimentes.....	132
Abbildung 7-9: Sortierung fluoreszierender Partikel.....	134
Abbildung 7-10: Quantitative Auswertung des Sortierexperimentes.....	136
Abbildung 7-11: Fluoreszenzmarkierung biologischer Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Farbstoffe.....	138
Abbildung 7-12: Optimierung der Fluoreszenz FITC gefärbter Zellen.....	138
Abbildung 7-13: Optimierung der Fluoreszenz biologischer Zellen durch weitere Farbstoff- und Filterkombinationen	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 7.1: Standard Filtersätze	137
Tabelle 7.2: Erweiterte Filtersätze	139

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACN	Acetonitril
AKF	Autokorrelationsfunktion
ALD	Atomic Layer Deposition
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CA	Contact Angle
CCD	Charge-coupled device
CD	Critical Dimension
CTC	Circulating Tumor Cells
CW	continious wave
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
EWOD	Electrowetting on Dielectrics
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
IgG	Immunglobulin G
ITO	Indiumzinnoxid

LOC	Lap on a Chip
Mb	Myoglobin
MEMS	Mikroelektronische mechanische Systeme
Mtl. 3	Metallebene 3
Mtl. 4	Metallebene 4
Mtl. 5	Metallebene 5
μTAS	Mico Total Analysis Systems
nDEP	Negative Dielektrophorese
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Phycoerythrin
POC	Point of Care
PPi	Pyrophosphat
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNR	Signal-to-Noise Ratio / Signal-Rausch-Verhältnis
ssDNA	single stranded DNA
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
twDEP	traveling wave Dielektrophorese
USB	Universal Serial Bus

Formelzeichen

Lateinische Schriftzeichen

Symbol	Einheit	Bedeutung
A	$[m^2]$	Fläche
A_x	$[m^2]$	Fläche eines infinitesimalen Flächenelementes
C	$[F]$	Kapazität
d	$[m]$	Dicke einer elektrischen Doppelschicht
d'	$[m]$	Abstand zwischen Deckel- und Bodenelektrode
g	$[\frac{m}{s^2}]$	Erdbeschleunigung
h	$J\ s$	Plancksches Wirkungsquantum
\vec{E}	$[\frac{V}{m}]$	elektrische Feldstärkevektor
F_γ	$[N]$	Kraft zur Vergrößerung einer Oberfläche
h	$[m]$	Höhe einer Flüssigkeitssäule
I_0	J	eingestrahlte Energie
I_{sat}	J	Sättigungsenergie eines Fluorophors
L	$[m]$	Länge
\vec{l}	$[m]$	Abstandsvektor zwischen Ladungen eines Dipols
N_{Fl}		Anzahl der Fluorophore
p	$[Pa]$	Druck
\vec{p}	$[D]$	elektrisches Dipolmoment

q	[C]	elektrische Ladung
$ Q $	[C]	Betrag einer Punktladung
QE		Quanteneffizienz einer Kamera
r_{\min}	[m]	minimaler Radius eines transportablen Tropfens
s	[m]	Kantenlänge eines infinitesimalen Flächenelementes
T_0		Transmissionsfaktor einer Kamera
U	[V]	elektrische Spannung
W	[J]	Arbeit

Griechische Schriftzeichen

Symbol	Einheit	Bedeutung
α	[°]	Winkel zwischen Tangentialebene und Kraft
γ_{SL}	$[\frac{\text{J}}{\text{m}^2}]$	Oberflächenspannung fest/flüssig
γ_{LG}	$[\frac{\text{J}}{\text{m}^2}]$	Oberflächenspannung flüssig/gasförmig
γ_{SG}	$[\frac{\text{J}}{\text{m}^2}]$	Oberflächenspannung fest/gasförmig
$\delta_{+/-}$		Positive bzw. negative Partialladung
ϵ_0	$[\frac{\text{A s}}{\text{V m}}]$	elektrische Feldkonstante
ϵ_l	$[\frac{\text{A s}}{\text{V m}}]$	Permittivität einer Flüssigkeit
η		Quanteneffizienz eines Fluorophors
ν	Hz	Frequenz eines Photons
Ω	sr	Raumwinkel
φ	[V]	elektrisches Potential
ρ	$[\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}]$	Dichte
θ	[°]	Kontaktwinkel zw. Feststoff und Flüssigkeit
σ	[N]	Normalkomponente der Oberflächenspannung
σ_{abs}	$[\frac{1}{\text{m}}]$	Absorptionskoeffizient
Φ		Erzeugte Photoelektronen an einem CCD-Sensor

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und Zielsetzung

Ein weitverbreitetes Anwendungsgebiet der Zellsortierung ist der Bereich der biologischen und klinischen Forschung. Vor diesem Hintergrund wird die Technologie üblicherweise regelmäßig zur Untersuchung von Stammzellen oder zur Entwicklung von Therapien gegen neurodegenerative Erkrankungen eingesetzt [1]. Den aktuellen Stand der Technik bildet derzeit die Durchflusszytometrie. Sie basiert auf einem seriellen Sortierkonzept, bei dem einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeführt und fluoreszenzabhängig durch ein elektrisches Feld sortiert werden [2]. Die Sortiergeschwindigkeit scheint, aufgrund des seriellen Zelldurchsatzes, an ihr Maximum gestoßen zu sein. Zusätzlich können biologisch gefährliche Aerosole beim Übergang der Zellen von dem Flüssigkeitsstrom in den Bereich des Lasers entstehen. Ungeeignet sind die Systeme ebenfalls für Untersuchungen auf der Einzelzelebene oder zur optischen Betrachtung der Zellen. In dieser Hinsicht lassen sich die Zellen lediglich anhand ihrer Fluoreszenz oder der Streuung des Laserstrahls beurteilen. Das Automatisierungspotential des gesamten Sortierungsprozesses ist ebenfalls als nahezu erschöpft anzusehen. So ist eine manuell auszuführende Probenpräparation und Zellmarkierung vor der Sortierung nötig, und auch nach

dem Abschluss des Sortiervorganges muss die Kultivierung der Zellen oder die Durchführung von Bioassays per Hand durchgeführt werden.

Weiterhin sind die Beschaffungskosten der Geräte und ihre Größe wirtschaftlich nachteilig für öffentliche und private Laborbetreiber.

Eine Möglichkeit, die genannten Nachteile der Durchflusszytometrie zu umgehen, liefert die Mikrochip-basierte Zellsortierung. Sie verspricht eine erhöhte Sortiergeschwindigkeit durch eine parallele Zellsortierung und eine schonendere Zellbehandlung. Weiterhin verhindert die Technologie die Entstehung toxischer Aerosole durch die Verkapselung des gesamten Sortierprozesses in ein mikrofluidisches System. Durch die Möglichkeit, den Sortierprozess zu unterbrechen und die Option, das Probenmaterial auf dem Chip unter einem Mikroskop zu betrachten, können einzelne Zellen auch hinsichtlich ihrer Morphologie analysiert werden. Ein sequentieller Aufbau unterschiedlich funktionaler mikrofluidischer Chips kann zu einer Automatisierung des gesamten Sortierprozesses genutzt werden. Vor diesem Hintergrund wäre es vorstellbar, dass Teile der Probenpräparation oder Anschlussexperimente ebenfalls auf EWOD-Chips durchgeführt werden, die in einem direkten Kontakt zu der Sortierplattform stehen. Der Begriff EWOD bezeichnet in diesem Zusammenhang eine Technik, die als „Electrowetting on Dielectric“ bekannt ist. Charakteristisch für dieses Verfahren ist eine dielektrische Schicht, welche sich zwischen der Elektrode und der Flüssigkeit befindet und die die Elektrolyse wässriger Lösungen verhindern soll [3]. Vom wirtschaftlichen Standpunkt aus gesehen, könnte die kostengünstige und massenhafte Produktion des Chips ein Vorteil gegenüber der Durchflusszytometrie bieten [4]. Allerdings ist festzuhalten, dass die Anregung der Fluoreszenz durch externe Geräte ausgeführt wird, die einen zusätzlichen Kostenfaktor darstellen. Ähnliches gilt für die Dimensionen des Gerätes. Während die Zellsortierung auf den kleinen Bereich des Mikrochips begrenzt ist, stellt die Anregungsquelle der Fluoreszenz den größten Teil des apparativen Aufbaus da.

Aus den genannten Gründen war es das Ziel der Arbeit, die Grundlagen für den Aufbau einer Mikrochip-navigierten Zellsortieranlage zu erschließen. Das Konzept der Anlage basiert auf einem digitalen mikrofluidischen Chip, auf dem Tropfen mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Zellspezies geteilt werden,

bis die einzelnen Zellpopulationen getrennt voneinander vorliegen. Die Diskriminierung der Zellen soll dabei durch eine Fluoreszenzanregung ausgeführt werden. Es ist beabsichtigt, die Fluoreszenzanregung und die Steuerung des Mikrochips in einen Regelkreis einzubinden, der eine automatisierte Zellsortierung erlaubt.

Als erste Aufgabe sollte ein optisches System identifiziert werden, welches erlaubt, fluoreszierende Zellen mit einem Durchmesser von $10\text{ }\mu\text{m}$ auf einer Fläche von $2 \times 2\text{ cm}^2$ zu erkennen. Als zusätzliche Vorgabe sollten die Zellen in mikrofluidischen Systemen erfasst werden können.

Eine weitere Herausforderung lag darin, das Layout für ein Elektrodenarray zu erzeugen, das durch einen bereits vorhandenen CMOS-Prozess gefertigt werden sollte.

Ferner stellte sich die Aufgabe des Aufbaus einer Mikrofluidik über dem Elektrodenarray, die einen Flüssigkeitstransport erlaubt.

Weiterhin sollte aus dem konstruierten EWOD-Chip ein steuerbares funktionsfähiges Modul erzeugt werden, mit dessen Hilfe die relevanten Fluidoperationen nachgewiesen werden können. Außerdem sollten Teilungsexperimente an fluoreszierenden Partikeln das „proof of principle“ des Konzeptes liefern.

1.2 Stand der Technik

In diesem Abschnitt werden unterschiedliche mikrosystemtechnische Verfahren zur Sortierung von Zellen und Partikeln vorgestellt. Dabei wird zwischen Verfahren, bei denen das Electrowetting angewendet wird, und allgemeinen mikrosystemtechnischen Entwicklungen, die der Separation von Zellen dienen, differenziert. Außerdem wird ein Überblick über weitere Nutzungsmöglichkeiten des Electrowettings gegeben, wobei der thematische Schwerpunkt auf der biologischen Anwendung liegt.

1.2.1 Zell- und Partikelseparation mittels Electrowetting

In einer Veröffentlichung von Chen et al. [5] wurde das Verfahren des Electrowettings mit der Technik der Dielektrophorese kombiniert, um Zellen

des Immunsystems voneinander zu trennen. Vor diesem Hintergrund wurde eine EWOD-Plattform hergestellt, die es erlaubt, zellhaltige Flüssigkeitstropfen zu transportieren und zu teilen. Zudem wurden Positionen auf dem Elektrodenarray konstruiert, an denen unterschiedliche Zellspezies aufgrund dielektrophoretischer Kräfte räumlich voneinander getrennt werden. So wurde, innerhalb eines Flüssigkeitstropfens, eine räumliche Trennung von dendritischen Zellen und T-Zellen herbeigeführt, wobei die Teilung des Tropfens mit beiden Zellspezies und damit die Trennung der Zellpopulationen noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Das gleiche Prinzip wandten Cho et al. [6] an, um negativ geladene carboxylierte Latexpartikel von ungeladenen Polystyrolpartikeln zu trennen. Jedoch kamen, statt dielektrophoretischer Kräfte, elektroforetische Kräfte zum Einsatz. Die Experimente ergaben, dass sich die unterschiedlichen Partikelsorten zu jeweils 70 % in den unterschiedlichen Tropfen anreichern ließen.

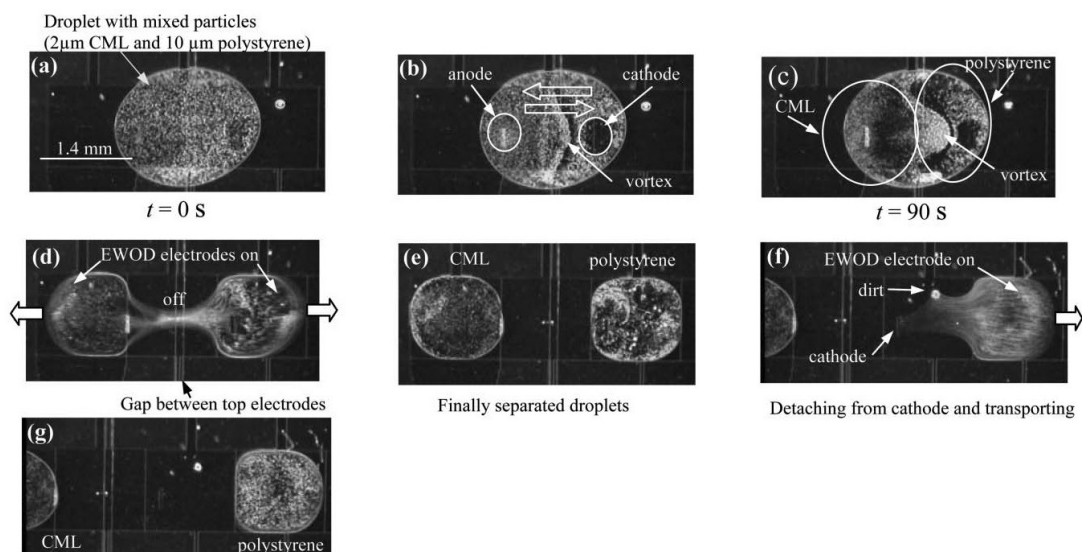


Abbildung 1-1: Cho et al. zeigten eine Sequenz zur Trennung von negativ geladenen Latexpartikeln und ungeladenen Polystyrolpartikeln. Durch Elektrophorese (b) wurden die unterschiedlichen Partikel innerhalb des Tropfens räumlich voneinander getrennt, danach erfolgte eine Teilung des Tropfens (d).

Zur Anreicherung bzw. zur Trennung von Zellen von Restpartikeln, benutzten Shah et al. [7] optoelektronische Pinzetten. HeLa Zellen wurden zunächst mit

Hilfe eines optisch steuerbaren elektrischen Feldes lokal innerhalb eines Flüssigkeitstropfen angereichert und daraufhin durch den EWOD-Effekt geteilt.

Weiterhin versuchten Shah et al. [8] magnetische von nicht magnetischen Beads zu trennen, indem sie diamagnetische Beads innerhalb eines Flüssigkeitstropfens an einem Magneten konzentrierten und daraufhin den Tropfen teilten. In der gleichen Veröffentlichung versuchten die Autoren, CD8 positive (CD8+) von CD8 negativen (CD8-) Zellen zu trennen. Dazu markierten sie die CD8+ Zellen mit magnetischen Beads, die spezifische Antikörper gegen das CD8 Protein trugen, während die CD8- Zellen unmarkiert blieben. Flüssigkeitstropfen, die beide Zelltypen beinhalten, wurden daraufhin mittels Electrowetting in die Nähe eines Magneten transportiert, sodass die magnetisierten CD8+ Zellen an der Oberfläche des Magneten akkumulierten und die CD8- Zellen im Tropfen verteilt blieben. Eine Teilung des Tropfens hatte zur Folge, dass sich sämtliche CD8+ Zellen zwar in der Nähe des Magneten anreicherten, sich jedoch ebenfalls im selben Tropfen einige CD8- Zellen befanden. Eine vollständige Trennung fand nicht statt. Lediglich eine Anreicherung der CD8+ gegenüber den CD8- Zellen konnte erzielt werden. Es wurde zudem berichtet, dass Adhäsionen der Partikel an der Oberfläche der Elektroden auftraten und die Effizienz der Sortierung verringerten. Durch die wiederholte Bewegung des Meniskus des Tropfens über die Partikel wirkte die Kraft der Oberflächenspannung auf die Partikel, sodass sich diese wieder im Tropfen lösten und eine höhere Sortiereffizienz erreicht werden konnte [9].

Versuche, die Effizienz der Trennung zu maximieren, machten ebenfalls Shah et al. [10]. Sie verbanden einen Tropfen mit einem Gemisch aus magnetischen und nicht magnetischen Beads mit einem partikelfreien Tropfen über einen schmalen Kanal, sodass kaum Diffusion zwischen den beiden Tropfen stattfand. Im Bereich des partikelfreien Tropfens wurde ein magnetisches Feld angelegt, worauf magnetische Beads in den partikelfreien Tropfen transportiert wurden und die nicht magnetischen Beads im ursprünglichen Tropfen verblieben. Die Quantifizierung des Experimentes ergab, dass 97 % der nicht magnetischen Partikel eliminiert und 99 % der magnetischen Beads angereichert werden konnten.

Eine weitere Antwort auf das geschilderte Problem fanden Wang et al. [11]. Sie experimentierten mit Lösungen, die sowohl magnetische Beads als auch Latex-

partikel enthielten. Im Unterschied zu dem zuvor beschriebenen Verfahren wurde der Tropfen mit den gemischten Partikeln mit einem partikelfreien Tropfen gemischt, sodass ein Tropfen entstand, der ein größeres Volumen aufwies und in dem sich in einer Hälfte sämtliche Partikel befanden, während in der anderen Hälfte keine Partikel zu finden waren. Durch Positionierung eines Magneten an der partikelfreien Seite wanderten ausschließlich die magnetischen Beads in die leere Hälfte des Flüssigkeitstropfens, da die Diffusion der Latexpartikel, aufgrund der Brownschen Molekularbewegung, wesentlich langsamer ablief als die Diffusion der magnetischen Partikel innerhalb des magnetischen Feldes. Blieben ohne den zusätzlichen Verdünnungsschritt nach der Teilung noch über 35 % der Latexpartikel in dem mit magnetischen Partikeln angereicherten Tropfen, so ließen sich durch den zusätzlichen Zwischenschritt 92 % aller Latexpartikel aus diesem Tropfen entfernen.

Zhao et al. [12] nutzten einen ähnlichen experimentellen Ansatz, jedoch verwendeten sie zur Manipulation der Partikel das Verfahren der traveling-wave Dielektrophorese (twDEP). Es gelang, Mischungen aus Aldehyd/Sulfat (AS) Latexbeads und Glasbeads sowie Mixturen aus biologischen Sporen und Glasbeads zu separieren. Dabei wurde im erst genannten Experiment eine Aufteilung erreicht, bei der 97 % der AS beads in einem Tropfen und 77 % der Glasbeads in einem anderen Tropfen zu finden waren. Bei dem zuletzt erwähnten Versuch befanden sich nach der Tropfenteilung 92 % der Sporen und 86 % der Glasbeads in unterschiedlichen Tropfen.

1.2.2 Mikrofluidik-basierte Methoden zur Zell- und Partikelseparation

Grundsätzlich lassen sich die auf mikrofluidischen Systemen basierenden Methoden zur Separation von Zellen in aktive und passive Systeme unterteilen. Aktive Systeme umfassen alle Methoden, die externe Felder benutzen, um Zellen zu bewegen. In diesem Zusammenhang sind vor allem akustische, elektrische, magnetische und optische Felder zu nennen, wohingegen passive Methoden primär auf Trägheitskräften, Filtern und Adhäsionsmechanismen basieren. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Techniken anhand der benötigten Methoden zur Präparation der Zellen vor einem Sortiervorgang gegliedert (Markierung durch Fluoreszenz bzw. Beads oder markierungsfreie Verfahren).

Gegenüber herkömmlichen Methoden bieten mikrosystemtechnische Verfahren zur Trennung von Zellen eine geringere Größe des benötigten Equipments, eine Vermeidung von biologisch gefährlichen Aerosolen und eine Vereinfachung komplexer Arbeitsprotokolle [13].

Bei den fluoreszenzbasierten Methoden werden unterschiedliche Zelltypen durch verschiedene Fluoreszenzmarker voneinander unterschieden, weshalb der erste Schritt die Präparation der Zellen mit geeigneten Markern beinhaltet. Die Sortierung wird fortgesetzt, indem die Zellen seriell an einem Laser vorbeigeführt und klassifiziert werden. Schließlich werden diese Informationen genutzt, um die Zellen mit Hilfe unterschiedlicher physikalischer Prinzipien zu sortieren.

Eine Möglichkeit, die Bewegung der Zellen zu steuern, beruht auf elektrokinetischen Mechanismen. Beispielsweise entwickelten Takahashi et al. [14] ein mikrofluidisches System aus PDMS, durch welches zwei parallele laminare Flüssigkeitsströme geführt wurden, die in unterschiedlichen Ausgängen endeten. Vor den Ausgängen befanden sich unterschiedlich geladene und mit Gleichspannung betriebene Elektroden. Der Bereich zwischen den Elektroden wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und einer CCD-Kamera überwacht. Gemische aus fluoreszenzmarkierten und nicht markierten Zellen wurden auf einem der Strömungspfade eingespeist und vor den Ausgängen auf das Merkmal der Fluoreszenz kontrolliert. In diesem Fall hatte die Detektion fluoreszenznegativer Zellen eine Aktivierung der Elektroden zur Folge, sodass die Partikel durch die elektrophoretischen Kräfte auf den parallelen Strömungspfad gelangten und einen anderen Ausgang erreichten als die fluoreszenzmarkierten Zellen, die sich mit der ursprünglichen Strömung bewegten.

Yao et al. [15] verwendeten das gleiche Prinzip, jedoch stand ihr Chip aufrecht, sodass die Bewegung der Zellen durch die Schwerkraft erzeugt wurde.

Guo et al. zeigten eine ähnliche Methode zur Sortierung zellhaltiger Tropfen mit Hilfe elektrophoretischer Kräfte [16].

An Stelle der Elektrophorese kann ebenfalls die Dielektrophorese (DEP) zur Sortierung der Zellen genutzt werden. Bei der Technik wird anstatt eines Gleichstroms eine Kombination aus Gleich- und Wechselstrom genutzt, um die betreffenden Teilchen zu polarisieren und sie im Anschluss in Abhängigkeit von

der elektrischen Feldstärke zu positionieren. Werden Zellen von der maximalen elektrischen Feldstärke angezogen, handelt es sich um eine positive DEP. Verfahren, bei denen die Zellen zur minimalen Feldstärke wandern, werden als negative DEP (nDEP) bezeichnet [17].

Wang et al. [18] konstruierten ein System, welches auf der Grundlage von nDEP biologische Zellen und Polystyren-Beads entlang des Querschnittes eines flüssigkeitsdurchströmten Kanals unterschiedlich positionierte, wodurch diese zu unterschiedlichen Ausgängen geführt werden konnten.

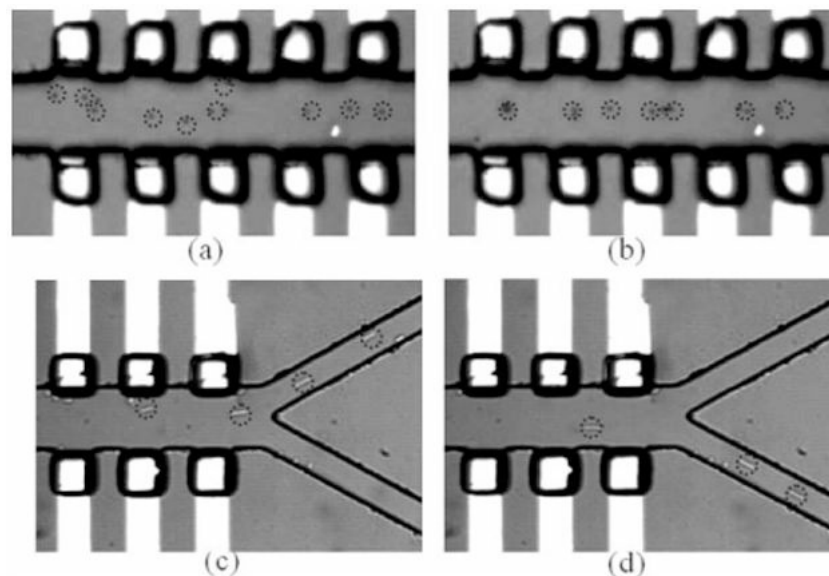


Abbildung 1-2: Wang et al. verwendeten die Methode der negative Dielektrophorese, (nDEP) um biologische Zellen zu manipulieren. (a) Ungerichtete Bewegung von Beads ohne DEP-Effekt. (b) Fokussierung der Beads in der Mitte des Kanals durch beidseitige Aktivierung der Elektroden. (c-d) Sortierung neuronaler Stammzellen einer Maus durch asymmetrische Beschaltung der gegenüberliegenden Elektroden.

Baret et al. [19] sortierten E. coli Stämme, die sich in der Expression des Reporter-Enzyms β -Galactosidase unterschieden. Während ein Stamm das für das Enzym codierende lacZ Gen enthielt, war in dem Genom des anderen Stammes das Gen nicht vorhanden. Einzelne E-coli Zellen wurden in einer Lösung emulgiert, die ein Substrat enthielt, welches bei einer Expression der β -Galactosidase umgesetzt wird und zur Emission von fluoreszierendem Licht führt. Über ein Fluoreszenzmikroskop wurden die einzelnen Tropfen hinsicht-

lich ihrer Fluoreszenz überprüft und gemäß des Merkmals mittels Dielektrophorese in einen entsprechenden Kanal gelenkt.

Ein ähnliches Prinzip benutzten Fu et al. [20], um unterschiedlich fluoreszierende Beads oder Greenfluorescentprotein (GFP) exprimierende E-coli Zellen von nicht fluoreszierenden Zellen zu trennen. Allerdings diente den Forschern in diesem Fall ein elektroosmotischer Fluss zur Regulation der Zellbewegung.

Weitere Möglichkeiten, Partikel oder Zellen auf bestimmte Trajektorien innerhalb eines mikrofluidischen Kanals zu zwingen, bieten akustische Wellen.

Beispielsweise realisierten Jakobsson et al. [21] eine fluoreszenzbasierte Sortierung von Beads, in dem sie akustische Volumenwellen zur Fokussierung der Partikel nutzten. Zunächst wurden sämtliche Partikel durch ein permanentes akustisches Signal fokussiert. Daraufhin folgten die Bestimmung der Fluoreszenzintensität und eine signalgekoppelte Applikation einer temporären akustischen Welle zur Separation der Zellen.

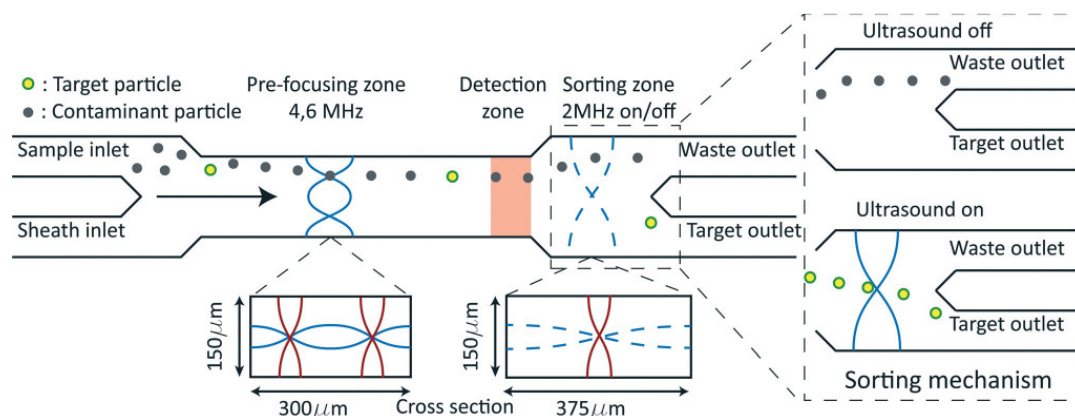


Abbildung 1-3: Bei der Zellsortierung nach Jakobsson et al. wurden akustische Wellen zur Manipulation der Zellen verwendet. Im vorderen Bereich der Mikrofluidik wurden sämtliche Partikel zunächst fokussiert. Im weiteren Verlauf fand eine Fluoreszenzmessung statt, auf dessen Grundlage gegebenenfalls eine akustische Welle erzeugt wurde, welche die entsprechende Zelle zu ihrem Zielausgang lenkte.

Wu et al. [22] kontrollierten fluoreszierende Zellen durch Erzeugung expandierender lokaler Kavitäten innerhalb des Transportmediums. Sie erhitzen mit Hilfe eines Lasers temporär die Flüssigkeit, in der sich die Zellen befanden, und erzeugten somit Blasen, die eine Ablenkung der Zellen hervorrief. Je nach Ein-

stellung des Gerätes konnten Durchsätze von 20000 Zellen/s bei einer Reinheit von 37% oder 1500 Zellen/s mit einer Reinheit von >90% erzielt werden.

Um fluoreszierende Zellen zu trennen, setzten einige Forschergruppen auch mechanische Systeme ein. So entwickelten Chen et al. [23] ein System, das auf der Regulation von Drücken durch Ventile basiert. Dabei werden Zellen zu einer Kreuzung aus mikrofluidischen Kanälen transportiert, daraufhin wird ihre Fluoreszenz gemessen und schließlich wird durch die Betätigung eines Ventils in Abhängigkeit von dem Messergebnis ein Unterdruck an den entsprechenden Kanal angelegt und die Zelle in den selbigen befördert.

Sämtliche bisher aufgeführten Systeme diskriminierten die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenz. Ein weiteres Prinzip, nachdem Zellen voneinander getrennt werden können, beinhaltet die spezifische Bindung von Beads an entsprechende Zielzellen. Die Beads werden in diesem Fall dazu benutzt, um ihren Bindungspartnern spezifische Eigenschaften zu verleihen, sodass diese innerhalb externer Felder von den nicht markierten Zellen getrennt werden können.

Die Magnetophorese zeichnet sich zum Beispiel dadurch aus, dass zunächst Beads mit magnetischen Eigenschaften spezifisch an bestimmte Zellen binden und mit Hilfe eines magnetischen Feldes schließlich Kräfte auf die magnetisierten Zellen ausgeübt werden können.

Hoshino et al. [24] nutzten die beschriebene Technologie zur Isolierung von Krebszellen aus einer Blutprobe. Als erstes wurde gesundes Blut mit Krebszellen versetzt und im nächsten Schritt wurden Antikörper gekoppelte, magnetische Nanopartikel hinzugegeben, die an die Krebszellen banden. Dabei wurden die Zelllinien COLO205 und SKBR3 sowie ein Antikörper gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül verwendet. Der Aufbau zur Isolierung der Zellen bestand primär aus einem mikrofluidischen Kanal aus Polydimethylsiloxan (PDMS) und mehreren Magneten, die an der Unterseite des Kanals angebracht waren. Floss die Blutprobe durch den Kanal, lagerten sich die markierten Zellen an dessen Boden ab, wodurch 90% der COLO205 und 86% der SKBR3 Zellen angereichert werden konnten.

Shields et al. [25] modifizierten die Eigenschaften von KG1a Zellen und Partikeln durch die Kopplung von Beads, die aus einem Elastomer bestanden, und erzeugten dadurch ein verändertes Migrationsverhalten der Zellen in der Nähe

akustischer Wellen. Partikel reagieren auf akustische Wellen, indem sie sich entweder zur maximalen oder zur minimalen Amplitude der Wellen bewegen. Ihre Bewegungsrichtung ist dabei von der Dichte und der Kompressibilität abhängig. Bei dem genannten Versuch bewegten sich die verwendeten Zellen in Richtung maximaler und die aus einem Elastomer bestehenden Beads in Richtung minimaler Amplitude einer stehenden akustischen Welle innerhalb eines mikrofluidischen Systems. Um die Bewegung der Zellen zu modifizieren, wurden die Beads mit den Zellen gekoppelt. Über einen biotinylierten CD34 Antikörper erhielten die Zellen einen Biotin-Rest, während sich Streptavidin-Moleküle an den Beads befanden. Die Streptavidin-Biotin Verbindung stellte einen Komplex aus beiden Komponenten her, der vollständig die Bewegungseigenschaften des Elastomers annahm und sich somit deutlich von dem ursprünglichen Verhalten der Zellen unterschied.

Wie bereits erwähnt, sind Kräfte, die von elektrischen Feldern auf kleine Objekte ausgeübt werden, häufig von der Größe der Objekte abhängig. So stand hinter der Arbeit von Hu et al. [26] die Idee, die Größe und Morphologie einzelner Zellen durch zusätzlich anhaftende Polystyren-Beads zu verändern und diese mit Hilfe der Dielektrophorese von den nicht markierten Zellen zu trennen. Innerhalb eines mikrofluidischen Kanals wurden zwei Strömungspfade für unterschiedliche Medien parallel nebeneinander geführt. Ein Strömungspfad enthielt die markierten und nicht markierten Zellen, während die andere Strömung lediglich eine Pufferlösung führte. Durch eine Reihe von Elektroden erfuhren die Komplexe aus Zellen und Beads eine Kraft, die sie aus ihrer ursprünglichen Bahn in die parallele Strömung lenkte. Da beide Strömungen in unterschiedlichen Ausgängen mündeten, konnten somit relativ reine Populationen der markierten Zellproben gewonnen werden.

Im Vergleich zu den bisher vorgestellten Methoden beruht die Zellsortierung ohne die Verwendung von Markern nicht nur auf dem Einsatz von aktiven Systemen und somit dem Einsatz von externen Feldern, sondern ebenfalls auf passiven Systemen wie Filtration oder Immobilisierung. Bei diesen Verfahren sind vor allem die intrinsischen Eigenschaften der Zellen, wie Größe, Form, Dichte, Elastizität, Polarisierbarkeit und magnetische Suszeptibilität, entscheidend.

Peterson et al. [27] demonstrierten eine Trennung von Erythrozyten von Lipidpartikeln durch stehende akustische Wellen. Dazu machten sie sich die unterschiedliche Dichte und Kompressibilität der beiden Partikel zu nutzen. Innerhalb einer Mikrofluidik erzeugten sie eine stehende akustische Welle und ließen eine mit Lipidpartikeln angereicherte Blutprobe hindurch strömen. Daraufhin akkumulierten die Erythrozyten um die minimale Amplitude und die Lipidpartikel um die maximale Amplitude der akustischen Welle. Ein laminarer Fluss transportierte beide Partikelsorten schließlich zu unterschiedlichen Ausgängen.

Auch das bereits vorgestellte Prinzip, bei welchem zwei parallele Fluidströme zu unterschiedlichen Ausgängen führten und durch ein elektrisches Feld den einzelnen Partikeln der entsprechende Strömungspfad zugeordnet werden konnte, wandten Kim et al. [28] auf nicht markierte Zellen an, die sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden. Dabei macht die Tatsache, dass Zellen, die sich in unterschiedlichen Phasen des Zyklus befinden und dabei verschiedene Volumina annehmen, erst eine dielektrophoretische Trennung möglich. Als Endresultat ließen sich bei einem Durchsatz von 2×10^5 Zellen/h 96% der Zellen in der G1 Phase anreichern.

Das Verfahren der Magnetophorese lässt sich bei unbehandelten Zellen vornehmlich auf Erythrozyten anwenden, da diese Spezies einen natürlichen Eisengehalt aufweist. In diesem Zusammenhang entwickelten Han et al. [29] eine Methode zur Aufteilung von roten und weißen Blutzellen. In der Mitte eines mikrofluidischen Kanals wurde über die gesamte Länge ein magnetischer Draht geführt. An einer Seite befand sich ein Eingang für flüssige Proben, und an der anderen Seite wurden drei verschiedene Ausgänge installiert. Nach der Einspeisung einer Blutprobe lenkte das Magnetfeld die diamagnetischen weißen Blutkörperchen zu den Wänden des Kanals, während die paramagnetischen roten Blutkörperchen von dem Draht in der Mitte des Kanals angezogen wurden. Letztlich erreichten die Blutzellen unterschiedliche Ausgänge, wodurch die endgültige Trennung vollzogen wurde.

Optische Systeme eignen sich ebenfalls dazu, nicht markierte Partikel oder Zellen voneinander zu trennen.

Hoi et al. [30] konstruierten auf der Basis einer PDMS-Matrix zwei übereinander liegende sich kreuzende Kanäle, die am Ort des Kreuzungspunktes miteinander verbunden waren. In den unteren Kanal wurde eine Suspension eingespeist, die aus unterschiedlich großen Polystyren-Beads bestand. Im oberen Kanal befand sich partikelfreies deionisiertes Wasser. Die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeiten wurde in beiden Kanälen durch eine Spritzenpumpe reguliert, sodass eine Durchmischung der Flüssigkeiten vermieden werden konnte. Am Kreuzungspunkt der Kanäle erfasste ein Laserstrahl die Partikel, sodass diese selektiv, mittels optisch induzierter Kräfte, aus dem unteren Kanal in den oberen Kanal übertraten. Die Selektivität beruhte in diesem Fall auf der Interaktion des Laserstrahls mit den Partikeln. Traf der Laser auf einen Partikel, wurde dieser polarisiert und von dem elektromagnetischen Feld des Lichtes angezogen. So erfuhren größere Partikel eine stärkere Kraft als kleinere Partikel und verblieben länger auf der Kreuzung. Als zweite Kraft wirkte ein unterschiedlicher Strahlungsdruck senkrecht zur Flussrichtung auf die Partikel. Dieser war abhängig von dem Brechungsindex, der Größe sowie der Intensität des Lasers. Insgesamt befanden sich also große Partikel länger im Fokus des Lasers und erhielten einen stärkeren Impuls in Richtung des partikelfreien Kanals. Um die Teilchen zu separieren, wurden die Intensität des Lasers und die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeiten so eingestellt, dass Partikel mit einem großen Durchmesser in den oberen Kanal wechselten, während die kleineren Partikel in dem ursprünglichen Kanal verblieben. Die Sortierrate betrug bei dem beschriebenen Verfahren fast 100%.

Eine weitere Möglichkeit, Zellen bezüglich ihrer Größe zu trennen, bieten Hindernisse, die in einem periodischen Abstand zueinander aufgebaut werden und welche lediglich Objekte mit einem bestimmten Durchmesser passieren können. Huang et al. [31] erzeugten innerhalb einer Mikrofluidik unterschiedlich breite Migrationspfade, in dem sie Hindernisse periodisch anordneten. Partikel innerhalb von Suspensionen, die die Mikrofluidik passierten, zwangen die Hindernisse auf einen ihrer Größe entsprechenden Pfad, so dass sie den Ausgang der Mikrofluidik gemäß ihrem Durchmesser sortiert erreichten.

Andere Vorhaben beabsichtigten, Zellen auf Oberflächen zu immobilisieren. So entwickelten Lee et al. [32] Oberflächen, auf denen sich P-Selectin befand und

ermöglichte somit eine transiente Immobilisierung von HL60 Zellen, welche den zu P-Selectin affinen Liganden PSGL-1 trugen.

Hyun et al. [33] erzielten eine Anreicherung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTC) durch negative Selektion. CD45 Antikörper wurden innerhalb einer Mikrofluidik immobilisiert, sodass Leukozyten aus einer Blutprobe entfernt wurden und die CTCs in der Probe zurück blieben.

Xu et al. [34] zeigten, dass ebenfalls Aptamere zur Immobilisierung von CTCs geeignet sind.

1.2.3 Biomedizinische Anwendung von EWOD-Systemen

Mikroelektronische mechanische Systeme (MEMS) werden in der Biomedizin häufig als Biosensoren, Separatoren, Mikrosonden und diagnostische Systeme eingesetzt. Die Möglichkeit, Mikrostrukturen, Sensoren und Aktuatoren auf einem Chip zu integrieren, liefert die Grundlage für den Aufbau von "lab on a chip (LOC)" Systemen, „Micro Total Analysis Systems (μ TAS)“ und „point of care (POC)“ Methoden. Der Vorteil der Geräte besteht vor allem in einem geringen Medienverbrauch und einer schnellen Reaktionszeit. Insbesondere vermeiden digitale mikrofluidische Systeme gegenüber mikrofluidischen Geräten mit einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom Kreuzkontaminationen, komplexe Flussregulationen, und sie bieten eine höhere Effektivität bei Mischvorgängen [35].

Shen et al. [36] entwickelten ein digitales, mikrofluidisches EWOD-System zur Detektion von SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Da es auf Hybridisierungsreaktionen der Proben-DNA mit Oligonukleotid tragenden magnetischen Beads beruht, wurden Heizelemente in die Deckelelektrode integriert. Zudem kamen magnetische Felder zum Einsatz, um die magnetischen Beads samt hybridisierter DNA anzureichern.

Grundsätzlich wurden zunächst magnetische Partikel hergestellt, die eine zu den SNPs komplementäre DNA-Sequenz trugen. Außerdem wies die Sequenz weiter stromabwärts eine Komplementarität zu einer Biotin markierten DNA-Sonde auf. Die präparierten Beads, die Proben-DNA und die Sonden reagierten in einem ersten Schritt miteinander, sodass zuerst die Proben-DNA und dann die Sonden direkt hintereinander auf der DNA-Sequenz der Beads banden. Hy-

bridisierte eine Proben-DNA mit einem SNP, kam es zu einer vollständigen Hybridisierung, während die nicht mutierte DNA an der letzten Stelle vor der Sonde ein ungepaartes Basenpaar aufwies. Durch den Einsatz einer Taq-DNA-Ligase wurden deshalb die SNP-haltigen Proben mit der Sonde ligiert, während dies für die unveränderte DNA nicht der Fall war. Die Entfernung der nicht ligierten Biotin-Sonden erfolgte in einem Waschschrift, auf den eine Markierung der ligierten Biotin-Sonden mit einem fluoreszierenden Streptavidin Marker folgte. Schließlich waren die SNP-DNA tragenden Beads deutlich anhand ihrer Fluoreszenz zu erkennen, und die SNPs konnten nachgewiesen werden.

Hua et al. [37] benutzten ein digitales mikrofluidisches System zur Amplifikation von DNA. Das System ermöglichte die automatische Durchführung einer Real-Time Polymerase Chain Reaction und beinhaltete den Transport der Medien, die Kontrolle der Prozessparameter sowie die vollständige Analytik. Sämtliche Chemikalien und Reaktanten, wie PCR-Puffer, dNTPs, Primer, Taq-Polymerase oder bakterielle DNA, ließen sich mit Hilfe des EWOD-Systems transportieren. Die Kontrolle der Temperatur während der PCR, die Detektion der Fluoreszenz und die Spannung der Elektroden stellte ein Träger-Gerät bereit, in welches der EWOD-Chip temporär integriert werden konnte. Die Effizienz des Prozesses wurde anhand der DNA der Bakterien *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Candida albicans* getestet.

Liu et al. [38] demonstrierten die molekularbiologische Technik der Klonierung anhand eines EWOD-Chips. Die zu integrierende DNA stammte aus einem Lambda-Phage und wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten. Ein pUC19 Plasmid mit den gleichen Erkennungssequenzen diente als Vektor. Beide Komponenten wurden zusammen mit dem Enzym DNA-Ligase mit Hilfe der EWOD-Plattform miteinander vermischt und die Phagen-DNA in das Plasmid integriert. Außerhalb des Mikrochips fand die Aufnahme des DNA-Konstruktes durch kompetente *E. coli* Zellen statt. Die Selektion der erfolgreich manipulierten Zellen erfolgte durch die Kultivierung der Bakterien auf einem Ampicillin-haltigen Medium. Eine Extraktion der Vektoren mit anschließendem Verdau (enzymatische Fragmentierung des Vektors) durch das Restriktionsenzym *HindIII* und eine Elektrophorese bewiesen den Erfolg des Klonierungsexperimentes.

Digitale mikrofluidische Systeme können ebenfalls zur DNA-Sequenzierung eingesetzt werden. Vor allem das Verfahren der Pyrosequenzierung lässt sich auf diese Art von Systemen übertragen.

Allgemein funktioniert die Pyrosequenzierung, in dem auf einem ssDNA Fragment (single stranded DNA) sequentiell komplementäre dNTPs angelagert werden. Die Reaktion wird durch eine Lichtemission begleitet, die schließlich Auskunft über die Art des angelagerten dNTPs gibt.

Auf molekular biologischer Ebene bedeutet dies, dass zunächst ein Primer mit dem zu sequenzierenden DNA-Fragment hybridisiert wird und zu diesem Konstrukt eine Lösung aus DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Luciferin, Apyrase und Adenosin -5'-Phosphosulfat (APS) hinzugegeben wird. Im nächsten Schritt wird eine Sorte dNTPs zu der Lösung hinzugefügt. Ist das Molekül komplementär zur ssDNA hinter dem Primer, kommt es zur Polymerase katalysierten Basenpaarung und zur Freisetzung eines Pyrophates (PPi). Die ATP-Sulfurylase setzt daraufhin das PPi und das APS zu ATP um, sodass die Luciferase ATP getrieben Luciferin in Oxyluciferin umwandeln und somit sichtbares Licht erzeugen kann. Sollten die dNTPs nicht komplementär sein, sorgt die Apyrase für deren Abbau, und die nächste Sorte dNTPs kann hinzugefügt werden.

Boles et al. [39] übertrugen das gesamte Protokoll auf einen digitalen mikrofluidischen Chip (DMF-Chip) und zeigten eine Sequenzierung anhand einer 60 Basenpaare langen Sequenz.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der DMF-Chips ist die Proteinanalytik. Dieser Forschungsbereich behandelt den Aufbau und die Funktion von Proteinen, die Rolle der Proteine im Metabolismus oder ihre Aufgaben als Komponenten von Organen der Organismen.

Vor allem der Aufbau und die Funktion der Proteine lassen sich anhand der Massenspektroskopie bestimmen, da das Verfahren einen Aufschluss über die Massen der einzelnen Aminosäuren und die funktionellen Gruppen gibt. Die relevanten Arbeitsschritte der Proteinextraktion, der Kristallisation und der Aufnahme eines Massenspektrums konnte bereits auf DMF-Chips durchgeführt werden.

Jebrail und Wheeler [40] demonstrierten den für eine Massenspektroskopie vorbereitenden Arbeitsschritt der Präzipitation anhand der Proteine Rinderse-

rumalbumin (BSA), Fibrinogen und Myoglobin (Mb). Die Proteine durchliefen dabei eine Präzipitation, einen Waschschriff und eine Resolubilisierung. Bei der Präzipitation des BSA wurde zum Beispiel Ammoniumsulfat verwendet, um die Proteine auszufällen. Die Reinigung erfolgte in einer Chloroform/Acetonitril (ACN) Lösung, gelöst wurden die Präzipitate in Boratpuffer. Eine Fluoreszenz basierte Quantifizierung der Präzipitate zeigte, dass die Leistung der miniaturisierten Methode mit herkömmlichen Methoden vergleichbar ist.

Ein weiteres potentiellcs Einsatzgebiet digitaler mikrofluidischer Systeme bieten Immonoassays. Sie dienen dazu, mit Hilfe immobilisierter Antikörper die Konzentration von Biomolekülen in wässrigen Lösungen zu detektieren.

Miller et al. [41] gelang es nach diesem Prinzip IgG-Antikörper zu quantifizieren. Sie immobilisierten Anti-IgG-Antikörper auf bestimmten Bereichen der Deckelelektrode und führten einen humanen IgG-Antikörper haltigen Tropfen mehrmals an dieser Stelle vorbei, sodass die beiden Antikörper spezifische Bindungen ausbilden konnten. Darauf folgten einige Waschschriffe, um die nicht gebundenen Moleküle zu entfernen, und schließlich wurde ein FITC markierter Anti-IgG-Antikörper zur Markierung der Zielmoleküle genutzt. Die Messung der Fluoreszenz mit Hilfe eines Mikroplattenlesers zeigte, dass die entwickelte Methode im Vergleich mit herkömmlichen 96-well basierten Verfahren eine ähnliche Sensitivität aufwies. Eine Isolierung der Zielproteine aus komplexeren Lösungen wurde anhand von IgG-Antikörper angereichertem Rinderserum demonstriert.

Digitale mikrofluidische Chips sind ebenfalls geeignet, um zellhaltige Proben zu verarbeiten. So zeigten Witters et al. [42] ein Verfahren zur Kultivierung biologischer Zellen. Sie entwickelten zunächst ein Verfahren zur Strukturierung des Teflons, welches auf Masken aus Parylen C und dem Einsatz eines O₂-Plasmas basierte. Auf den vom Teflon befreiten Bereichen wurde Poly-L-Lysin zur Verstärkung der Zelladhäsion abgeschieden. Zell-Kultivierungsversuche auf dem Poly-L-Lysin zeigten, dass die Zellen an diesen Stellen adhärten und für ca. 3 Tage vital blieben.

Barbulovic-Nad et al. [43] demonstrierten Zytotoxizitätstests, indem sie Tropfen mit Jurkat-T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Tween 20 mischten und die Zellvitalität anhand von Fluoreszenzmarkern bestimmten. Die

Experimente ergaben, dass eine verbesserte Sensitivität gegenüber herkömmlichen Methoden erreicht werden konnte.

Bio-MEMS sind ebenfalls in der Lage den Bedarf an portablen biomedizinischen Geräten zu decken. Sie sind in der Lage, als „Point of Care“ Systeme unmittelbar am Aufenthaltsort des Patienten DNA, Proteine und Zellen zu analysieren. So extrahierten und quantifizierten Mousa et al. [44] mit Hilfe eines digitalen Chips das Hormon Östrogen, welches eine bedeutende Rolle bei der Physiologie der menschlichen Reproduktion spielt und im Zusammenhang mit der Pathogenese von Brustkrebs steht.

1.3 Fortschritt durch die Mikrochip-navigierte Zellsortierung

In diesem Abschnitt werden die beschriebenen mikrosystemtechnischen Verfahren zur Sortierung von Partikeln und Zellen noch einmal zusammenfassend betrachtet und mit dem Konzept der Mikrochip-navigierten Zellsortierung verglichen. Dadurch sollen die Unterschiede und Fortschritte deutlich werden, die das entwickelte Verfahren gegenüber den herkömmlichen mikrosystemtechnischen Methoden besitzt. Sämtliche Electrowetting-basierte Verfahren zur Trennung von unterschiedlichen Zellspezies wiesen gemeinsame Merkmale auf. So wurde generell ein zellhaltiger Tropfen an eine Position gebracht, in der die räumliche Trennung der unterschiedlichen Zellpopulationen innerhalb des Tropfens stattfand. Die Kräfte für die Trennung wurden durch die Verfahren der Dielektrophorese und der Elektrophorese erzeugt oder durch optoelektronische Pinzetten sowie magnetische Felder bereitgestellt. Mittels des Electrowettings lief im nächsten Schritt eine Teilung des Tropfens ab, sodass sich die unterschiedlichen Zellpopulationen letztlich in verschiedenen Tropfen befanden.

Das in der vorgelegten Arbeit entwickelte Konzept der Zellsortierung erweitert den Stand der Technik, in dem es nicht nur eine Position zur Trennung der Zellen vorsieht, sondern mehrere Positionen, sodass eine parallelisierte Zellsortierung durchgeführt werden kann. Auf dem Chip ist es also möglich, mehrere Sortieroperationen gleichzeitig durchzuführen und somit einen höheren Durchsatz zu erreichen. Weiterhin steckt hinter der Anordnung der Elektroden ein Konzept, das den bloßen Nachweis des Trennungsmechanismus überschreitet und

bereits auf die Anwendung des Verfahrens abzielt. Vor diesem Hintergrund soll der Chip in Zukunft an einen intelligenten Sortieralgorithmus gekoppelt werden, welcher eine automatisierte Zellsortierung ermöglicht. Um eine parallele Sortierung erreichen zu können, ist es notwendig, eine entsprechende Anzahl von Elektroden auf dem Chip zu positionieren und anzuschließen. Vor allem der Anschluss einer großen Anzahl von Elektroden kann zu Überschneidungen von Leiterbahnen und somit zu einer falschen Adressierung der Elektroden führen. Deshalb wurde, abweichend von sämtlichen bisher in der Literatur beschriebenen Ansätzen, eine zweilagige Leiterbahnführung gewählt, um die Anzahl der nutzbaren Elektroden zu erhöhen.

Einige gezeigte Konzepte verwenden laminare Strömungen, um Flüssigkeiten und Zellen durch die Mikrofluidiken zu transportieren. Auch diese Thematik wird bei der vorliegenden Methode auf eine andere Weise gelöst. Das Electrowetting ermöglicht den Transport diskreter Flüssigkeitsmengen, die exakt gesteuert werden können. So ist es möglich, kleinste Flüssigkeitstropfen an jedem Ort des Chips individuell zu mischen oder zu teilen, ohne dass sich diese Operationen auf das gesamte System auswirken. Im Gegensatz dazu hätte die Anpassung von laminaren Flüssigkeitsströmen eine größere Auswirkung auf die Statik eines Systems. Es lässt sich also feststellen, dass das Electrowetting eine Flexibilität und Freiheitsgrade ermöglicht, die durch die Verwendung laminarer Ströme nicht erreicht werden könnten. Weiterhin liegt den strömungsbasierten Verfahren ein serielles Sortierkonzept zugrunde, während die Mikrochip-navigierte Sortierung parallel abläuft.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Mikrochip-navigierte Zellsortierung die bisherigen Ansätze vor allem um die Möglichkeit einer automatisierten und parallelisierten Zellsortierung ergänzt. Um diesen Parallelisierungsgrad zu erreichen, mussten technische Probleme gelöst werden, die bei den bereits vorhandenen Methoden nicht auftraten. So mussten 456 Elektroden auf einem Mikrochip untergebracht und angeschlossen werden. Zudem erreichte der Chip, durch die hohe Anzahl an Elektroden, eine Größe, die es problematisch machte, den gesamten Chip zu betrachten und gleichzeitig 10 μm große fluoreszierende Zellen zu erkennen. Weiterhin mussten der Chip und die Fluoreszenzdetektion in einer Messschleife miteinander gekoppelt werden,

um eine automatisierte Sortierung zu ermöglichen. Der Aufbau der Sortieranlage wurde innerhalb des Forschungsprojektes MINAPSO (**M**ikrochip-**N**avigierte **P**arallel **S**ortieranlage) realisiert und durch das Ziel-2-Programm des Ministeriums für Wirtschaft, Energie, Industrie, Mittelstand und Handwerk des Landes Nordrhein-Westfalen im Rahmen des Innovationswettbewerbs NanoMikro+Werkstoffe gefördert. Als Projektpartner waren das Fraunhofer-Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme (IMS), der Fachbereich Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE) der Universität Duisburg-Essen, das Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen und die Bartels Mikrotechnik GmbH beteiligt. Die vorliegende Arbeit beinhaltet im Wesentlichen den Aufbau und die Charakterisierung der Mikrochip-navigierten Sortieranlage. Zunächst wird anhand einer Glassubstrat-basierten Electrowetting-Plattform (Funktionsmuster 1) des Projektpartners Bartels Mikrotechnik GmbH der Nachweis sämtlicher Fluidoperationen erbracht. Einen weiteren thematischen Schwerpunkt bildet die Herstellung eines CMOS-Sortierchips auf der Grundlage eines Sortieralgorithmus des Fachbereiches Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE) und dessen „Postprocessing“. Ferner wird die Integration des Electrowetting-Chips in eine automatisierte Messanordnung beschrieben, die als zusätzliche Komponenten eine Elektrodenansteuerung (Fraunhofer IMS, Abt. Transponder, Systeme und Anwendungen) und ein Fluoreszenzmikroskop enthält. Letztlich werden eine Charakterisierung des Mikrochips, Messungen von Partikelverteilungen sowie ein erfolgreiches Sortierexperiment demonstriert und somit das „proof of principle“ des Sortierkonzeptes erbracht.

2 Grundlagen des Electrowettings

Das folgende Kapitel beinhaltet eine physikalische Beschreibung des als Electrowetting bekannten Effektes. Dazu wird zunächst beschrieben, welche Kräfte innerhalb von Flüssigkeiten und an möglichen Grenzflächen zwischen unterschiedlichen Phasen auftreten. Weiterhin wird eine Beziehung zwischen den genannten Kräften und dem Konzept der Oberflächenspannung hergestellt. Ein weiteres Thema sind Kapillarkräfte und Kräfte an gekrümmten Oberflächen. Anschließend wird der Einfluss elektrischer Spannungen auf die Benetzung von Oberflächen dargestellt und ein Konstrukt hergestellt, welches die Elektrizität, die Oberflächenspannung als spezifische Eigenschaft der Flüssigkeit und die Morphologie des Tropfens in Form des Kontaktwinkels miteinander verbindet. Letztlich wird gezeigt, dass die Änderung des Kontaktwinkels ein guter Indikator für die entstehenden Kräfte während des Transports von Flüssigkeitstropfen ist, wobei er jedoch nicht die Ursache der Kräfte darstellt.

2.1 Kohäsions- und Adhäsionskräfte in Flüssigkeiten

Als Kohäsionskräfte werden die Bindungskräfte zwischen Atomen oder Molekülen innerhalb eines Stoffes bezeichnet, während die Adhäsionskräfte Wechselwirkungen in einer Grenzschicht beschreiben, die durch einen Feststoff und eine flüssige Phase gebildet werden.

Die intramolekularen Kohäsionskräfte hängen von der Struktur und den Eigenschaften der an einer Bindung beteiligten Atome ab. Grundsätzlich erzeugen diese Charakteristiken der Bindungspartner eine spezifische Elektronenverteilung, die schließlich die Art der chemischen Bindung festlegt. Unterschieden wird zwischen der Ionen-Bindung, der kovalenten Bindung und der metallischen Bindung. Bei der Ionen-Bindung gibt ein Element ein Elektron an den anderen Reaktionspartner ab, sodass entgegengesetzt geladene Ionen entstehen, die aufgrund ihrer elektrostatischen Anziehung zusammengehalten werden. Hingegen teilen sich Atome in kovalenten Bindungen ein Elektronenpaar, und in metallischen Bindungen sorgen delokalisierte Elektronen, die allen Atomen angehören, für die Stabilität der Moleküle. Die genannte Einteilung erfasst jedoch lediglich extreme Fälle mit eindeutig zuzuordnenden Elektronenverteilungen. In den meisten Verbindungen liegen Mischformen aus kovalenten und ionischen Bindungen vor, bei denen die Elektronen weder vollkommen einem Atom zugeordnet werden können (ionische Bindung), noch sich in einem äquidistanten Abstand zu beiden Atomkernen befinden (kovalente Bindung) (Abb.2.1). Als Ursache liegen den Mischformen primär die atomspezifischen Eigenschaften Kernladung und Elektronenkonfiguration zu Grunde. So sind beispielsweise Atome mit einer niedrigen Kernladungszahl und einer hohen Anzahl an Elektronenschalen leicht zu ionisieren, da die geringe Anzahl an Protonen im Kern und der abschirmende Effekt der Elektronenschalen zwischen Kern und Valenzelektronen für eine geringe Anziehung des Kerns auf die äußeren Elektronen sorgt. Aus den gleichen Gründen übt ein Atomkern innerhalb eines Moleküls mit hoher Kernladungszahl und einer geringen Anzahl an Elektronenschalen eine große Anziehungskraft auf die Elektronen aus. Für die Position der Elektronen innerhalb einer Bindung ist also entscheidend, wie stark die Elektronen von den jeweiligen Atomkernen angezogen werden. Sind die Anziehungskräfte der Kerne unterschiedlich stark ausgeprägt, entstehen asymmetrische Ladungsverteilungen innerhalb des Moleküls.

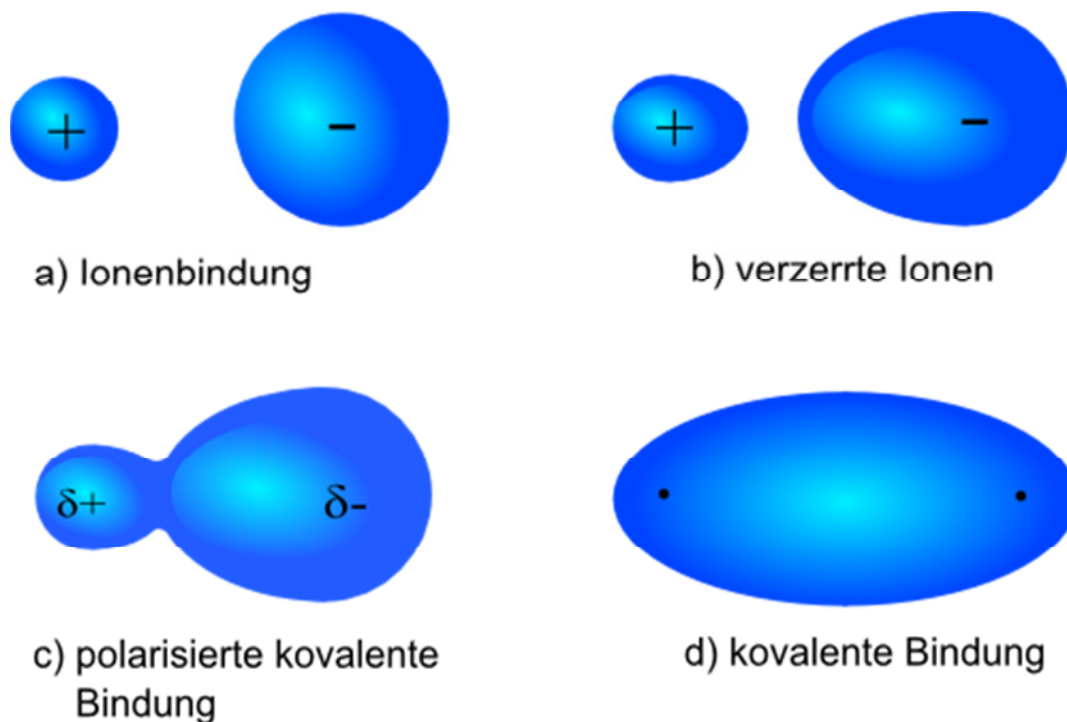


Abbildung 2-1: Übergang zwischen Ionen und kovalenter Bindung, die aufgrund unterschiedlich starker Anziehungskräfte der Atomkerne entstehen

Sind die Anziehungskräfte der Atomkerne extrem unterschiedlich, erhält ein Atom sämtliche Bindungselektronen, und es entstehen einzelne Ionen, die als Dipole bezeichnet werden [45]. In der Elektrostatik werden Dipole als zwei gleichgroße, ungleichnamige und räumlich voneinander getrennte Ladungen definiert, die sich in einem bestimmten Abstand voneinander befinden. Unter der Annahme, dass der Abstand zwischen den Ladungen von einem Polabstandsvektor \vec{l} beschrieben wird und dass dieser Vektor gegenüber dem Abstand zum Aufpunkt, in dem das Feld berechnet werden soll, sehr klein ist, kann mit Hilfe des Superpositionsprinzips eine Lösung für die Potentialfunktion $\varphi(\vec{r})$ und die elektrische Feldstärke $\vec{E}(\vec{r})$ gefunden werden. Werden die Ladungen axial angeordnet, sodass sie den gleichen Abstand zum Ursprung des Koordinatensystems besitzen, lässt sich das Potential mit den Abstandsvektoren $\vec{R}_+ = \vec{r} - \frac{\vec{l}}{2}$ und $\vec{R}_- = \vec{r} + \frac{\vec{l}}{2}$ als Summe der Einzelpotentiale der Ladungen $+|Q|$ und $-|Q|$ beschreiben:

$$\varphi(\vec{r}) = \frac{|Q|}{4\pi\epsilon_0} \left[\frac{1}{|\vec{R}_+|} - \frac{1}{|\vec{R}_-|} \right] \quad (2.1)$$

Durch eine Erweiterung lässt sich der Ausdruck umformen:

$$\varphi(\vec{r}) = \frac{|Q|}{4\pi\epsilon_0} \frac{|\vec{R}_-| - |\vec{R}_+|}{|\vec{R}_-||\vec{R}_+|} = \frac{|Q|}{4\pi\epsilon_0} \frac{|\vec{R}_-| - |\vec{R}_+|}{|\vec{R}_-||\vec{R}_+|} \frac{|\vec{R}_-| + |\vec{R}_+|}{|\vec{R}_-| + |\vec{R}_+|} \quad (2.2)$$

$$\varphi(\vec{r}) = \frac{|Q|}{4\pi\epsilon_0} \frac{|\vec{R}_-|^2 - |\vec{R}_+|^2}{|\vec{R}_-||\vec{R}_+|(|\vec{R}_+| + |\vec{R}_-|)} \quad (2.3)$$

Weiterhin lassen sich die Differenzen der quadratischen Terme modifizieren zu:

$$|\vec{R}_-|^2 - |\vec{R}_+|^2 = \left(\vec{r} + \frac{\vec{l}}{2} \right) \left(\vec{r} + \frac{\vec{l}}{2} \right) - \left(\vec{r} - \frac{\vec{l}}{2} \right) \left(\vec{r} - \frac{\vec{l}}{2} \right) = 2\vec{r} \cdot \vec{l} \quad (2.4)$$

so dass das Potential die Form

$$\varphi(\vec{r}) = \frac{2\vec{r} \cdot |Q|\vec{l}}{4\pi\epsilon_0 |\vec{R}_-||\vec{R}_+|(|\vec{R}_+| + |\vec{R}_-|)} \quad (2.5)$$

annimmt, wobei das Produkt $\vec{p} = |Q| \cdot \vec{l}$ Dipolmoment genannt wird. Ist zudem der Polabstand im Vergleich mit dem Abstand des Dipols zum Aufpunkt wesentlich kleiner ($|\vec{r}| \gg l$), so gilt $\vec{R}_+ \approx \vec{r}$ sowie $\vec{R}_- \approx \vec{r}$ und die Näherungsformel für das Potenzial des Dipols lautet:

$$\varphi(\vec{r}) = \frac{\vec{p} \cdot \vec{r}}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}|^3} \quad (2.6)$$

Da der Gradient des Potentialfeldes die elektrische Feldstärke beschreibt ($\vec{E} = -grad\varphi$), kann mit Hilfe dieser Beziehung die elektrische Feldstärke des Dipolfeldes berechnet werden.

$$\vec{E}(\vec{r}) = -grad\varphi(\vec{r}) = -\nabla \frac{\vec{p} \cdot \vec{r}}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}|^3} \quad (2.7)$$

Unter Einbeziehung der Beziehung $\text{grad}(f \cdot g) = g \cdot \text{grad} f + f \cdot \text{grad} g$ berechnet sich die elektrische Feldstärke zu [46]

$$\vec{E}(\vec{r}) = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left[\frac{1}{|\vec{r}|^3} \cdot \text{grad}(\vec{p} \cdot \vec{r}) + (\vec{p} \cdot \vec{r}) \cdot \text{grad} \frac{1}{|\vec{r}|^3} \right] \quad (2.8)$$

Die Auswertung der Gradienten ergibt

$$\text{grad} \frac{1}{|\vec{r}|^3} = -\frac{3}{|\vec{r}|^4} \cdot \vec{e}_r \text{ und } \text{grad}(\vec{p} \cdot \vec{r}) = \vec{p} \quad (2.9)$$

Vor diesem Hintergrund kann die elektrische Feldstärke durch den Ausdruck

$$\vec{E}(\vec{r}) = -\frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left[3 \frac{(\vec{p} \cdot \vec{r})}{|\vec{r}|^5} \vec{r} - \frac{\vec{p}}{|\vec{r}|^3} \right] \quad (2.10)$$

beschrieben werden. Ferner lässt sich erkennen, dass die elektrische Feldstärke mit $\frac{1}{|\vec{r}|^3}$ und das elektrische Potential mit $\frac{1}{|\vec{r}|^2}$ abklingen [47]. Neben den intramolekularen Kohäsionskräften gibt es auch intermolekulare Anziehungskräfte, die unterschiedliche Moleküle aufeinander ausüben. So werden Flüssigkeiten aus polaren Molekülen durch Dipol-Dipol Kräfte zusammengehalten, indem die negativen und die positiven Pole miteinander wechselwirken. Als Beispiel für diese Konfigurationen sind Wasserstoff-Brücken zu nennen. In den betreffenden Verbindungen sind Wasserstoff-Atome an stark elektronegative Sauerstoff-Atome gebunden. In Folge dessen üben die elektronegativen Atome eine Anziehung auf die Bindungselektronen aus und erzeugen somit eine positive Partialladung am Wasserstoffatom. Eine Wasserstoffbrücke wird gebildet, indem sich starke Anziehungskräfte zwischen einem freien Elektronenpaar eines negativen Atoms und einem Wasserstoff-Atom mit einer positiven Partialladung ausbilden. Auch unpolare Moleküle, die kein permanentes Dipolmoment besitzen, bilden intermolekulare Kräfte aus, die als London-Kräfte oder Dispersionskräfte bezeichnet werden. Für das Auftreten der Kräfte ist eine natürliche Verformung der Elektronenhülle verantwortlich, durch die eine Ausbildung eines Dipolmomentes im Molekül erfolgt. Da die Verformung sehr schnell auftritt und ständig ihre Orientierung wechselt, kann im Mittel kein Dipolmoment festgestellt werden. In den benachbarten Molekülen wird aber ebenfalls ein Dipol induziert,

welcher mit dem ursächlichen Dipol wechselwirkt und somit Anziehungskräfte verursacht. Als Ursache der Adhäsion können ebenfalls die mechanischen Adhäsion, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Brownsche-Molekularbewegungen genannt werden [45].

2.2 Die Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung ist die Folge von molekularen Kräften in den Grenzflächen von Flüssigkeiten und sorgt dafür, dass Flüssigkeiten ihre Oberfläche minimieren. Sie ist eine Kraft, die parallel zur Oberfläche wirkt und bestrebt ist, den kugelförmigen energetisch günstigsten Zustand von Flüssigkeiten zu erhalten.

2.2.1 Physikalisches Konzept der Oberflächenspannung

Der Begriff der Oberflächenspannung kann von einem mechanischen oder thermodynamischen Blickwinkel aus betrachtet werden.

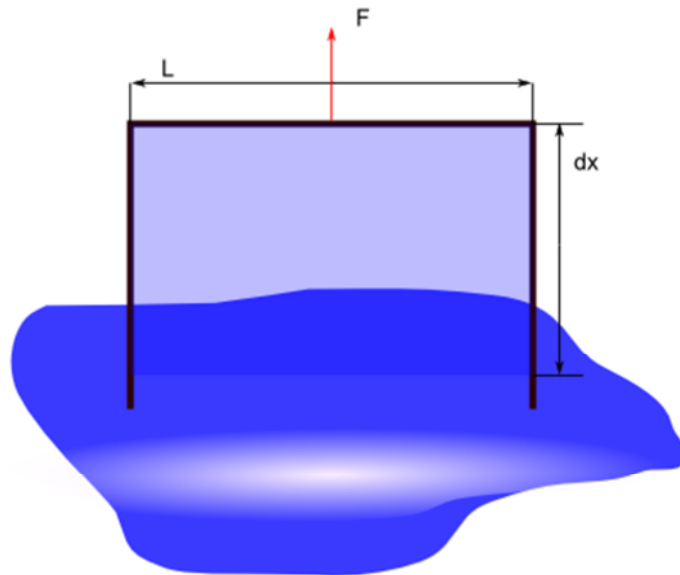


Abbildung 2-2: Modell zur mechanischen Betrachtung der Oberflächenspannung. Die Kraft, die benötigt wird, um einen Bügel der Länge L aus einer Flüssigkeit zu ziehen, multipliziert mit dem zurückgelegten Weg dx , ergibt die Oberflächenspannung.

Im Allgemeinen ist sie definiert als die Arbeit dW , die notwendig ist, um die Oberfläche einer Flüssigkeit um das Flächenelement dA zu vergrößern.

$$dW = \gamma dA \quad (2.11)$$

Von der mechanischen Betrachtungsweise aus kann die Oberflächenspannung aber auch als Kraft pro Länge (N/m) angegeben werden. Zugänglich wird diese Vorstellung durch die Annahme eines Bügels mit der Länge L , in den ein Flüssigkeitsfilm eingespannt ist und der um den Weg dx angehoben wird (Abb.2.2). Die Arbeit, die nötig ist, um den Flüssigkeitsfilm um eine Fläche dA zu vergrößern, lässt sich als

$$dW = F dx \quad (2.12)$$

darstellen, wobei die Fläche durch den Ausdruck

$$dA = 2L dx \quad (2.13)$$

gegeben ist und der zusätzliche Faktor 2 die Vorder- und Rückseite des Flüssigkeitsfilms berücksichtigt. Die Oberflächenspannung ergibt sich nun als

$$\gamma = \frac{dW}{dA} = \frac{F dx}{2L dx} = \frac{F}{2L} \quad (2.14)$$

Wird nicht die mechanische Arbeit, sondern der Energiezustand der Moleküle betrachtet, lässt sich feststellen, dass die Teilchen im Tropfeninneren aufgrund der höheren Anzahl an Interaktionspartnern einen niedrigeren Energiezustand aufweisen als die Teilchen in der Grenzschicht. Bei einem Transport eines Moleküls an die Oberfläche müssten demnach unter Aufwendung von Energie Bindungen gebrochen werden, die in der Grenzschicht nicht wieder hergestellt werden könnten. Die Proportionalität zwischen der entstandenen Differenz der Bindungsenergien und der Vergrößerung der Oberfläche wird durch die Oberflächenenergie beschrieben. Sie ist bei der Verwendung von Flüssigkeiten äquivalent zur Oberflächenspannung und wird in SI-Einheiten als J/m² angegeben [48].

$$\gamma = \frac{dE}{dA} = \frac{dW}{dA} \quad (2.15)$$

2.2.2 Molekulare Ursachen der Oberflächenspannung

Um zu verstehen, warum die Oberflächenspannung als Kraft parallel zur Oberfläche wirkt, müssen die abstoßenden und anziehenden Kräfte betrachtet werden, die auf die Moleküle in Flüssigkeiten wirken. Welche Kraft bei einer Interaktion zwischen zwei Molekülen dominiert, hängt von dem Abstand beider Moleküle ab und wird durch das Lennard-Jones-Potential beschrieben. Unterschreitet beispielsweise der Abstand zwischen zwei Molekülen einen bestimmten Wert, wirken abstoßende Kräfte, während die anziehenden Kräfte eher bei größeren Molekülabständen wirken. Weiterhin können die abstoßenden Kräfte als isotrop bezeichnet werden, was bedeutet, dass sie mit gleicher Intensität an jedem Punkt der Moleküle angreifen. Hingegen sind anziehende Kräfte anisotrop und daher richtungsabhängig. Bei der Betrachtung der Moleküle an der Oberfläche der Flüssigkeiten fällt auf, dass sie nur auf Seiten der wässrigen Phase mit Molekülen interagieren können, während ihnen in der Gasphase keine Moleküle für Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Aufgrund der isotropen Natur der abstoßenden Kräfte sind diese also in sämtlichen Raumrichtungen gleich groß, jedoch als Resultat der fehlenden Bindungspartner insgesamt kleiner als bei Molekülen im Inneren der Flüssigkeit. Die anziehenden Kräfte sind anisotroper Natur und müssen nicht mit gleicher Intensität an jeder Stelle des Moleküls angreifen. Somit unterscheidet sich auch ihre Stärke bei Grenzschichtmolekülen in Abhängigkeit von ihrer Orientierung. In vertikaler Richtung muss ihr Betrag dem Betrag der abstoßenden Kraft entsprechen, wenn sich die Flüssigkeit in einem statischen Zustand befindet und das Kräftegleichgewicht gewahrt bleiben soll. In horizontaler Richtung fehlen dem Molekül keine Bindungspartner, sodass die anziehenden Kräfte größer sein können als die abstoßenden. Diese Intensitätsdifferenz der Kräfte in horizontaler Richtung tritt tatsächlich bei Grenzflächenmolekülen auf, da wie erwähnt, die isotropen abstoßenden Kräfte aufgrund der fehlenden Bindungspartner der Moleküle in alle Raumrichtungen abgeschwächt sind, wohingegen die anziehenden Kräfte nur in vertikaler Richtung zur Wahrung des Gleichgewichtes verringert sind, jedoch in horizontaler Richtung keiner Veränderung unterliegen. Somit entsteht eine Kraft, die parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist. Im Inneren der Flüssig-

keit tritt diese Kraft nicht auf. Dort ist zum einen jedes Molekül vollständig von anderen Molekülen umgeben, wodurch die Verringerung der abstoßenden Kraft durch fehlende Moleküle verhindert wird, und die Dichte ist höher als in der Grenzschicht, wodurch sich die Moleküle häufiger in einem Abstand zueinander befinden, der die abstoßenden Kräfte begünstigt. So befinden sich abstoßende und anziehende Kräfte von Molekülen innerhalb einer Flüssigkeit in allen Raumrichtungen im Gleichgewicht, und es wirkt keine Netto-Kraft (Abb. 2.3).

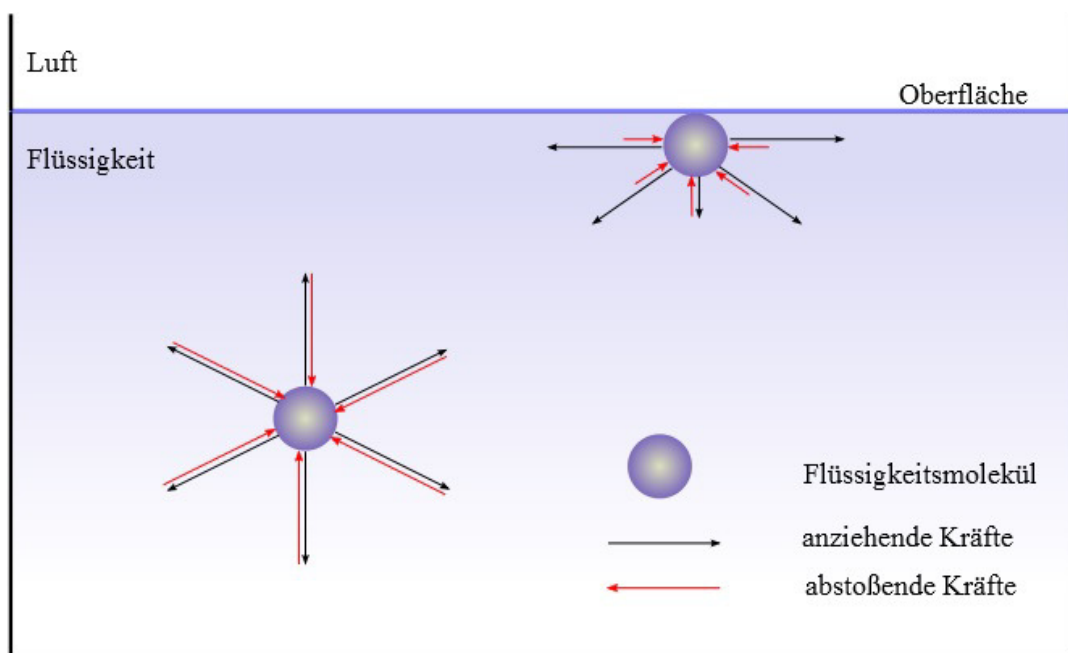


Abbildung 2-3: Darstellung der anziehenden und abstoßenden Kräfte zwischen Molekülen in einer Flüssigkeit. Während sich im Inneren der Flüssigkeit die Kräfte aufgrund einer symmetrischen Molekülanordnung ausgleichen, entsteht hingegen an der Oberfläche als Resultat fehlender Bindungspartner eine parallel zur Oberfläche gerichtete Kraft.

Die Schicht zwischen den Oberflächenmolekülen und den Molekülen im Inneren der Flüssigkeit, in der das Kräftegleichgewicht herrscht, ist nur wenige Mikrometer dick. Bewegt man sich durch diese Schicht und wertet dabei die an den Molekülen angreifenden Kräfte aus, erkennt man, dass sich die vertikalen Kräfte wiederum zur Wahrung des Kräftegleichgewichts ausgleichen. In horizontaler Richtung bleiben die anziehenden Kräfte stets konstant. Im Gegensatz dazu

nehmen die abstoßenden Kräfte in Abhängigkeit von der Dichte zu, bis sie nach wenigen Moleküllängen dem Wert der anziehenden Kräfte entsprechen [49].

2.2.3 Oberflächenspannung an gekrümmten Oberflächen

Die Auswirkung der Oberflächenspannung auf die geometrische Form und die dadurch entstehenden Druckverhältnisse in Flüssigkeiten können anhand eines Flüssigkeitstropfens beobachtet werden. Flüssigkeiten nehmen eine Tropfenform an, da sie die energetisch günstigste Anordnung der Moleküle bietet. In diesem Fall befindet sich eine maximale Anzahl von Molekülen im Inneren des Tropfens, wo sie in allen Raumrichtungen Bindungspartner finden und somit einen energetisch günstigeren Zustand einnehmen können als die Moleküle, die sich in der Grenzschicht aufhalten. Die tangential zur Oberfläche wirkenden Kräfte gleichen sich in diesem Fall aus, aber es entsteht aufgrund der Krümmung des Tropfens eine Kraft in Richtung des Tropfeninneren, die nach (2.16) ebenfalls als Druck dargestellt werden kann und deren Größe abhängig von der Oberflächenspannung ist.

$$F = p A \quad (2.16)$$

Die Laplace-Gleichung (2.17) beschreibt die Druckverhältnisse, die an den Grenzschichten von gekrümmten Flüssigkeiten herrschen. Bei einem Flüssigkeitstropfen wirken von außen nach innen zum einen der atmosphärische Druck p_{ex} und zum anderen die Komponente $2\gamma / R$, die aufgrund der erwähnten Minimierung der Oberfläche entsteht. Befindet sich das betrachtete System im Gleichgewicht, wird der gesamte nach Innen wirkende Druck durch den Innendruck p_{in} ausgeglichen. Für einen Tropfen in Form einer Kugel lassen sich die Druckverhältnisse wie folgt beschreiben

$$p_{\text{in}} = p_{\text{ex}} + \frac{2\gamma}{R} \quad (2.17)$$

Bei der Herleitung der Gleichung betrachtet man zunächst die Veränderung der Oberfläche einer Kugel mit dem Radius R von R nach $R + dR$ unter der Annahme $dR \ll R$

$$dA = 4\pi(R + dR)^2 - 4\pi R^2 = 8\pi R dR \quad (2.18)$$

Unter Einbeziehung der Oberflächenspannung lautet die dafür benötigte Arbeit

$$dW = 8\pi \gamma R dR$$

Die der Oberflächenvergrößerung entgegenwirkende Kraft erhält man aus der Entfernung der Wegkomponente dr aus dem Term für die aufgewendete Arbeit

$$F_\gamma = 8\pi \gamma R \quad (2.19)$$

Die gesamte nach innen gerichtete Kraft wird folglich durch den äußeren Druck ($4\pi r^2 p_{\text{ex}}$) sowie durch die weitere nach innen gerichtete Komponente erzeugt und entspricht der von innen nach außen wirkenden Kraft ($4\pi r^2 p_{\text{in}}$). Durch Umformung folgenden Ausdrucks erhält man die Laplace-Gleichung (2.17).

$$4\pi R^2 p_{\text{in}} = 4\pi R^2 p_{\text{ex}} + 8\pi \gamma R \quad (2.20)$$

Die Druckdifferenz zwischen Innen- und Außenseite ($p_{\text{in}} - p_{\text{ex}} = 2\gamma / R$) ist also nur von der Oberflächenspannung γ und dem Kugelradius R abhängig.

Die Druckdifferenz lässt sich ebenfalls an beliebig gekrümmten Grenzflächen berechnen. Dazu wird ein infinitesimales Element der Grenzfläche mit den Kantenlängen ds_1 und ds_2 , in dessen Zentrum ein Punkt x liegt, betrachtet (Abb.2.4). An der Berandung ds_1 greift tangential zur Grenzfläche und senkrecht zu ds_1 die zuvor beschriebene Kraft $\vec{F}_1 = \gamma d\vec{s}_1$ an, während an der Berandung ds_2 die Kraft $\vec{F}_2 = \gamma d\vec{s}_2$ in gleicher Weise wirkt. Da die Kräfte nicht genau parallel zur Tangentialebene des Punkt x liegen, besitzen diese eine Normalkomponente σ , die senkrecht zur Tangentialebene des Punktes x steht.

Unter der Voraussetzung, dass die betrachteten Winkel sehr klein sind, gilt $\sin(d\alpha_i) \approx d\alpha_i$, und es ergibt sich beispielsweise für die Normalkomponente der an der Strecke ds_1 angreifenden Kraft

$$\sigma = \gamma ds_1 \sin(d\alpha_2) = \gamma ds_1 d\alpha_2 \quad (2.21)$$

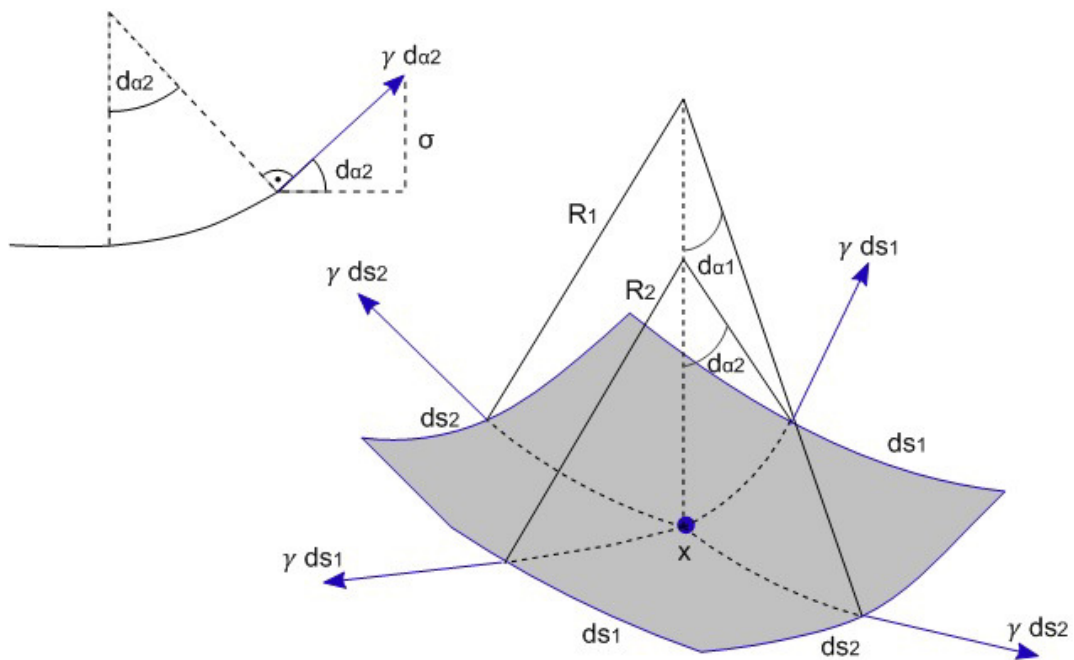


Abbildung 2-4: (links) Darstellung der durch die Grenzflächenspannung verursachten Kraft, bestehend aus einer vertikalen und einer horizontalen Vektorkomponente. (rechts) Grenzflächenelement inklusive angreifender Kräfte zur Bestimmung des Drucks unter Berücksichtigung der Grenzflächenspannungen.

Vor dem Hintergrund, dass in einem Phasengleichgewicht die Summe der Normalkomponenten der Kräfte an den Berandungslinien des infinitesimalen Flächenelementes dem Umgebungsdruck entsprechen muss, ergibt sich

$$\Delta p \, ds_1 \, ds_2 = 2\gamma \, ds_1 d\alpha_2 + 2\gamma \, ds_2 d\alpha_1 \quad (2.22)$$

Da es sich bei der Gleichung 2.22 um ein Kräftegleichgewicht handelt, wird der Umgebungsdruck Δp mit der Fläche ($A_x = ds_1 \, ds_2$) des infinitesimalen Flächenelementes multipliziert, sodass der Ausdruck auf beiden Seiten die Eigenschaft einer Kraft aufweist. Eine Substitution der Winkel durch Radien zweier Kreise, die tangential den Punkt x berühren, liefert die Gleichung für den Laplace-Druck in Abhängigkeit von den Hauptkrümmungsradien des Flächenelementes [50]:

$$\Delta p \, ds_1 \, ds_2 = \gamma \, ds_1 \frac{ds_2}{R_2} + \gamma \, ds_2 \frac{ds_1}{R_1} \quad (2.23)$$

$$\Delta p = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (2.24)$$

2.3 Die Oberflächenbenetzung

2.3.1 Kapillarität

Der Zusammenhang zwischen der Oberflächenspannung, der Benetzung von Oberflächen und den resultierenden Druckverhältnissen an gekrümmten Grenzflächen lässt sich anhand der Kapillarwirkung erklären.

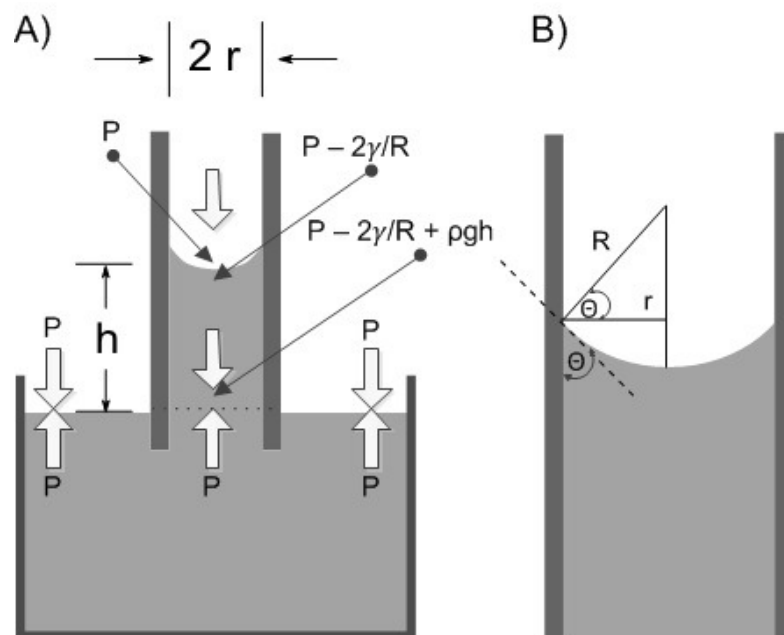


Abbildung 2-5: (A) Beschreibung der Druckverhältnisse innerhalb und außerhalb einer in eine Flüssigkeit getauchten Kapillare und der daraus resultierenden Steighöhe. (B) Verhältnis zwischen dem Radius R des als halbkugelförmig angenommenen Meniskus und dem Radius r der Kapillare sowie dem Kontaktwinkel Θ .

Wird beispielsweise eine Glaskapillare in Wasser getaucht, kann die Adhäsionsenergie zwischen der Flüssigkeit und dem Feststoff zu einer Benetzung der Wand führen, so dass die Flüssigkeit im Inneren der Kapillare gekrümmt wird (Abb.2.5).

Aus der Gleichung 2.17 geht hervor, dass der Druck auf der konkaven Seite einer Grenzfläche immer größer ist als auf der konvexen Seite. Für die Verhältnisse in der Kapillare bedeutet diese Gesetzmäßigkeit eine Verringerung des Druckes unter dem gekrümmten Meniskus gegenüber dem Außendruck um $2\gamma/R$, wobei R den Radius des halbkugelförmigen Meniskus darstellt. Der Außendruck P drückt nun die Flüssigkeit in die Höhe, bis das hydrostatische Gleichgewicht erreicht ist. Der Gleichgewichtszustand liegt vor, wenn der Druck, den die erzeugte Wassersäule ausübt, der Druckdifferenz zwischen Innen- und Außendruck entspricht.

Der hydrostatische Druck p der Wassersäule hängt von der Dichte ρ und der Höhe h ab.

$$p = \rho gh \quad (2.25)$$

Das Gleichsetzen dieses Ausdrucks mit der Druckdifferenz am Meniskus ($2\gamma/R$) erfüllt die Gleichgewichtsbedingung und liefert eine Möglichkeit zur Berechnung der Steighöhe der Flüssigkeit sowie eine Methode zur Bestimmung der Oberflächenspannung [48].

$$h = \frac{2\gamma}{\rho g R} \quad (2.26)$$

Die Steighöhe lässt sich ebenfalls mit Hilfe des Radius der Kapillare und des Kontaktwinkels zwischen der Flüssigkeit und der Kapillarwand ausdrücken (Abb.2.5), sodass sich folgender Ausdruck ergibt

$$h = \frac{2\gamma \cos\theta}{\rho g r} \quad (2.27)$$

2.3.2 Benetzung auf Festkörpern

Aus dem Zusammenspiel von Adhäsions- und Kohäsionskräften lässt sich ebenfalls nachvollziehen, wie sich eine Flüssigkeit (L) auf einem ebenen Festkörper (S) ausbreitet bzw. wie sie ihn benetzt.

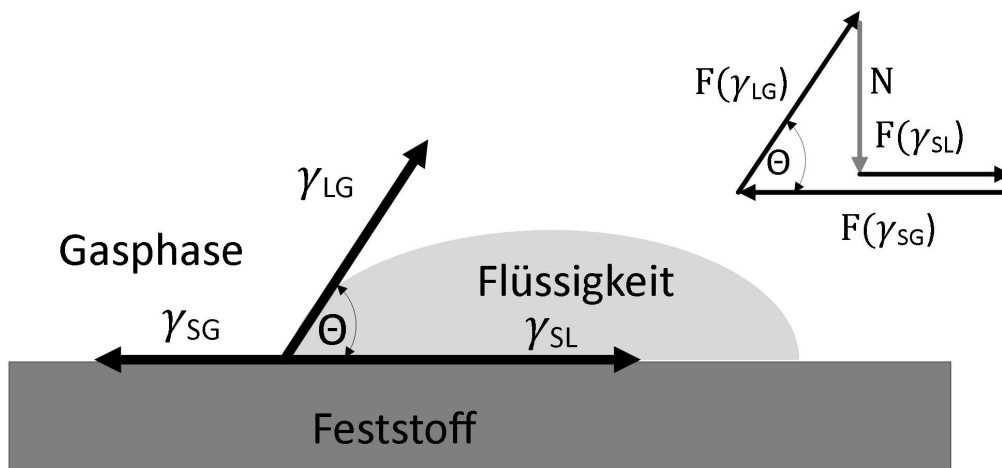


Abbildung 2-6: Querschnitt eines sich auf einem Festkörper befindlichen Flüssigkeitstropfens. Die durch die Oberflächenspannungen induzierten Kräfte bestimmen den Benetzungsgrad und damit den Kontaktwinkel Θ .

Bei der folgenden Betrachtung sind die Gewichtskraft und die Oberflächenrauheit vernachlässigt. Während einer Benetzung bilden sich drei Grenzflächen aus, zum einen zwischen dem Feststoff und der Flüssigkeit (SG), zum anderen zwischen der Flüssigkeit und der Gasphase (LG) und letztlich zwischen der Gasphase und dem Feststoff (SG) (Abb. 2.6). Wie bereits in Abschnitt 2.1 beschrieben, kann jeder Oberfläche eine Oberflächenspannung zugeordnet werden, die parallel zu der jeweiligen Grenzfläche verläuft. Befindet sich der Tropfen in einer Ruhelage, entsteht im Kontaktpunkt der drei Phasen ein Kräftegleichgewicht, und es bildet sich ein stabiler Kontaktwinkel aus. Da die Längen, an denen die Kräfte angreifen, bei allen Grenzflächen als identisch angenommen werden, genügt es, die Grenzflächenspannungen ins Gleichgewicht zu bringen, wobei \vec{e}_{ij} die tangential zur Grenzfläche verlaufenden Einheitsvektoren darstellen.

$$\gamma_{LG} \vec{e}_{LG} + \gamma_{SG} \vec{e}_{SG} + \gamma_{SL} \vec{e}_{SL} = \vec{0} \quad (2.28)$$

Weiterhin reicht es bei der beschriebenen Anordnung aus, lediglich die horizontalen Komponenten der Kräfte einzubeziehen, da die vertikale Komponente des Vektors der Oberflächenspannung an der Phasengrenze (LG) durch eine von dem Festkörper aufgebrachte Normalkraft \vec{N} (Adhäsionskraft) kompensiert wird. Für das Kräftegleichgewicht gilt somit:

$$\sum_i \vec{F}_i = \vec{F}(\gamma_{LG}) + \vec{F}(\gamma_{SG}) + \vec{F}(\gamma_{SL}) + \vec{N} = \vec{0} \quad (2.29)$$

Dieses Kräfteverhältnis lässt sich ebenfalls darstellen, in dem die Vektoren der Oberflächenspannungen auf den horizontalen Einheitsvektor \vec{e}_x projiziert werden, sodass nur die horizontalen Komponenten der Kräfte beachtet werden. Die Projektion wird über die Bildung der Skalarprodukte aus den Vektoren der Oberflächenspannungen und dem Einheitsvektor \vec{e}_x erreicht.

$$\gamma_{LG} \underbrace{\vec{e}_{LG} \cdot \vec{e}_x}_{=\cos \alpha} + \gamma_{SG} \underbrace{\vec{e}_{SG} \cdot \vec{e}_x}_{=-1} + \gamma_{SL} \underbrace{\vec{e}_{SL} \cdot \vec{e}_x}_{=1} = 0 \quad (2.30)$$

Durch Umformung der Gleichung kann der Kontaktwinkel direkt aus den Werten der Grenzflächenspannungen bestimmt werden.

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}} \quad (2.31)$$

Die als Youngsche Gleichung bekannte Formel erhielt ihren Namen nach ihrem Entdecker Thomas Young. Beträgt der Kontaktwinkel $\theta < 90^\circ$, liegt ein benetzendes Verhalten vor, ist θ hingegen $> 90^\circ$, spricht man von einem nicht benetzenden Verhalten. Anders ausgedrückt, breitet sich die Flüssigkeit auf dem Festkörper aus, wenn der Zustand $\gamma_{SG} > \gamma_{SL} + \gamma_{LG}$ gegeben ist oder die Flüssigkeit ist nicht benetzend, und es gilt $\gamma_{SL} > \gamma_{SG} + \gamma_{LG}$ [50].

2.3.3 Einfluss des elektrischen Potentials auf die Benetzung

Das Anlegen eines elektrischen Potentials induziert an der Grenzfläche zwischen dem Feststoff und der Flüssigkeit eine elektrische Doppelschicht. Sie be-

steht zum einen aus Ladungen an der Metalloberfläche und zum anderen aus einer Ladungsträgerwolke, bestehend aus entgegengesetzt geladenen Ionen auf der Seite der Flüssigkeit. Eine dielektrische Schicht zwischen der Elektrode und der Flüssigkeit wird in dem als Lippmann-Ansatz bekannten Modell nicht berücksichtigt. Der Zusammenhang zwischen der induzierten Flächenladungsdichte ρ_{SL} an einer Elektrodenoberfläche, der Oberflächenspannung γ_{LG} und dem elektrischen Potenzial U ist gegeben durch

$$d\gamma_{\text{SL}} = -\rho_{\text{SL}} dU \quad (2.32)$$

Es wird deutlich, dass die Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen der Elektrodenoberfläche und der Flüssigkeit durch das Anlegen einer Spannung U verändert werden kann. Es wird angenommen, dass sich die entgegengesetzt geladenen Ionen aus der Flüssigkeit in einem konstanten Abstand d zur Elektrodenoberfläche befinden und die elektrische Doppelschicht eine konstante Kapazität C besitzt, wobei ϵ_1 als Permittivität der Flüssigkeit und $\epsilon_0 = 8,8541878176 \cdot 10^{-12} \text{ F/m}$ als Dielektrizitätskonstante des Vakuums bezeichnet wird.

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_1 A}{d} \quad (2.33)$$

Durch Integration der Ladungsdichte über die Spannung kann die Oberflächenspannung an der Grenzfläche fest/flüssig bestimmt werden.

$$\gamma_{\text{SL}} = \gamma_{\text{SL}0} - \int_{U_0}^U \rho_{\text{SL}} dU \quad (2.34)$$

Die Proportionalität zwischen der Ladung q , die auf einen Kondensator gebracht werden kann, und der Spannung U ist allgemein gegeben durch

$$q = C U \quad (2.35)$$

Die Ladungsdichte ρ entspricht einer Ladung q pro Flächeneinheit A

$$\rho = \frac{q}{A} \quad (2.36)$$

Vor dem Hintergrund der Definitionen der Kapazität und der Ladung kann die Ladungsdichte an der Grenzschicht ebenfalls wie folgt ausgedrückt werden

$$\rho_{\text{SL}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_l}{d} U \quad (2.37)$$

Nach Einsetzen des Ausdrucks und Integration erschließt sich die Lippmann-Gleichung (2.38)

$$\gamma_{\text{SL}} = \gamma_{\text{SL}0} - \int_{U_0}^U C U \, dU = \gamma_{\text{SL}0} - \frac{C}{2} (U - U_0)^2 \quad (2.38)$$

Die Größe U_0 gibt die Spannung nach der Benetzung der Elektrode mit der Flüssigkeit wieder. In diesem Fall entstehen spontan Ladungen, sodass auch eine Spannung bei ausgeschalteter Spannungsquelle vorhanden ist. Die entsprechende Oberflächenspannung lautet $\gamma_{\text{SL}0}$. Ferner wird vorausgesetzt, dass der Spannungsabfall hauptsächlich über der Doppelschicht stattfindet und der Spannungsabfall über der leitenden Flüssigkeit vernachlässigt werden kann.

Die Young'sche Gleichung in Kombination mit der Lippmann-Gleichung bietet eine Möglichkeit, den Kontaktwinkel in Abhängigkeit von der angelegten Spannung zu bestimmen. Dazu werden zunächst die Youngschen Gleichungen im Fall angelegter und abgeschalteter Spannung aufgestellt, um schließlich in der Lippmann-Gleichung die Oberflächenspannungen γ_{SL} und $\gamma_{\text{SL}0}$ durch die entsprechenden Kontaktwinkel $\cos \theta$ und $\cos \theta_0$ zu ersetzen. Der erhaltene Ausdruck wird als Lippmann-Young-Gleichung (2.39) bezeichnet.

$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{C}{2\gamma_{\text{LG}}} (U - U_0)^2 \quad (2.39)$$

Stehen Flüssigkeiten in direktem Kontakt mit den Elektroden, kann durch das Anlegen von Spannungen Elektrolyse entstehen, welche zu irreversiblen Beschädigungen an den Elektroden führt. Um derartige elektrochemische Reaktionen zu verhindern, besteht die Möglichkeit, dielektrische Schichten auf die Elektroden aufzubringen. Bekannt sind die Verfahren, in denen zusätzlich Dielektrika eingesetzt werden, unter der Bezeichnung „Electrowetting on Dielectric“, was durch die Abkürzung EWOD zum Ausdruck gebracht wird. Die gesamte Anordnung besteht dann aus zwei in Serie geschalteten Kondensatoren, wobei die Kapazitäten zum einen durch die dielektrische Schicht und zum anderen durch die elektrische Doppelschicht hergerufen werden. Die kleinere

Kapazität kann der dielektrischen Schicht zugeordnet und in der Lippmann-Gleichung verwendet werden, während die größere spezifische Kapazität der elektrischen Doppelschicht vernachlässigbar ist. Ferner geht die Größe U_0 nicht mit in die Gleichung ein, da an der isolierenden Schicht keine spontanen Ladungsträger beim Eintauchen der Elektrode in die Flüssigkeit entstehen. Für die Lippmann-Young-Gleichung ergibt sich somit [51]

$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{C}{2\gamma_{LG}} U^2 \quad (2.40)$$

2.4 Fluidoperationen in geschlossenen EWOD-Systemen

In vielen technischen Anwendungen ist es erforderlich, Flüssigkeiten in Form von diskreten Volumina zu bewegen oder zu manipulieren. Vor diesem Hintergrund bietet der Effekt des Electrowettings Möglichkeiten, diese Notwendigkeiten zu realisieren. Im Folgenden werden Konzepte vorgestellt, die unterschiedliche Fluidoperationen anhand der bisher behandelten Grundlagen beschreiben. Die Fluidoperationen beziehen sich auf EWOD-Systeme und umfassen die Extraktion, den Transport, die Teilung und die Zusammenführung von Flüssigkeitstropfen.

2.4.1 Druckverhältnisse in Flüssigkeitstropfen

In den bisher gemachten Ausführungen wurde gezeigt, dass das Anlegen einer Spannung an eine Elektrode, auf der sich eine geeignete Flüssigkeit befindet, zu einer Kontaktwinkeländerung an der Grenzfläche fest/flüssig führen kann. Diesen Zusammenhang beschreibt die Lippmann-Young-Gleichung (2.39). Weiterhin wurde unter Einbeziehung der Laplace-Gleichung (2.24) erläutert, wie eine Änderung der Krümmung einer Grenzfläche, beispielsweise zwischen einer Flüssigkeit und einer Gasphase, zu einer Veränderung der Druckverhältnisse an der Grenzfläche führt. Nachstehend wird nun die Abhängigkeit der Druckverhältnisse von der angelegten Spannung anhand eines Tropfens in einem EWOD-System erörtert und gezeigt, dass eine asymmetrische Druckverteilung eine

Tropfenbewegung verursachen kann. Dabei wird angenommen, dass der Druck, welcher den Flüssigkeitstropfen bewegt, vergleichbar mit dem Kapillardruck in einer mit Flüssigkeit gefüllten Kapillare ist (2.41).

$$\Delta p = \frac{2\gamma \cos \theta}{r} \quad (2.41)$$

Das exemplarische EWOD-System besteht aus strukturierten Bodenelektroden und einer ganzflächigen Deckelelektrode. Zwischen den Elektroden befindet sich ein Flüssigkeitstropfen (Abb. 2.7).

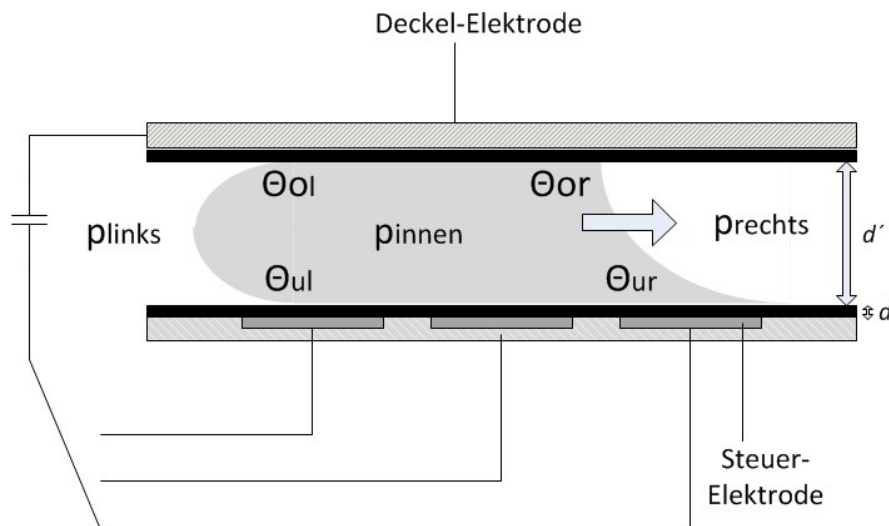


Abbildung 2-7: EWOD-System bestehend aus strukturierten Elektroden am Boden und einer ganzflächigen Deckel-Elektrode. Zwischen den Elektroden befindet sich ein Flüssigkeitstropfen, der durch Anlegen einer Spannung bewegt werden kann.

Zur Berechnung der Druckdifferenz Δp zwischen dem Druck auf der linken Seite Δp_{links} und der rechten Seite des Tropfens Δp_{rechts} wird Gleichung (2.42) herangezogen. Bezugnehmend auf die Abbildung 2.7 stellt γ_{LG} die Grenzflächen-spannung zwischen der flüssigen und der Gasphase dar. Die Kontaktwinkel an der oberen linken Elektrode θ_{ol} und der oberen rechten Elektrode θ_{or} sind in der Regel gleich groß, während die Kontaktwinkel an den unteren Elektroden θ_{ul} bzw. θ_{ur} sich in Abhängigkeit von der angelegten Spannung voneinander unterscheiden können, sodass der Ausdruck (2.43) hinsichtlich der Druckdiffe-

renz zwischen linker und rechter Seite des Tropfens auch nur die unteren Kontaktwinkel enthält [52].

$$\Delta p = \Delta p_{\text{links}} - \Delta p_{\text{rechts}} \quad (2.42)$$

$$\Delta p = \frac{\gamma_{\text{LG}}}{d'} (\cos \theta_{\text{ur}} - \cos \theta_{\text{ul}}) \quad (2.43)$$

Durch Einsetzen der Druckdifferenz in die Lippmann-Young-Gleichung ergibt sich eine Beziehung zwischen dem Druck und der angelegten Spannung.

$$\Delta p = \frac{\gamma_{\text{LG}}}{d'} (\cos \theta_{\text{ur}} - \cos \theta_{\text{ul}}) = \frac{\gamma_{\text{LG}}}{d'} \frac{1}{2} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\gamma_{\text{LG}} d} U^2 = \frac{1}{2} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d' d} U^2 \quad (2.44)$$

Es ist erkennbar, dass der Druck nicht von der Oberflächenspannung an den Grenzflächen abhängt, sondern nur Terme enthält, die sich auf die Systemgeometrie und die elektrischen Felder beziehen. Es kann festgehalten werden, dass durch Anlegen einer Spannung an eine Elektrode die Oberflächenspannung sowie die Form des Meniskus asymmetrisch geändert wird und eine Druckänderung innerhalb der Flüssigkeit zu einer Bewegung des Tropfens führt. Dabei können die Änderung des Kontaktwinkels und die Bewegung des Tropfens allerdings als getrennte Phänomene betrachtet werden [53].

So beinhaltet der elektromechanische Ansatz nur die elektrischen Felder als Ursache für die Benetzung von Festkörpern durch Flüssigkeiten. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass nach dem Anlegen einer Spannung entgegengesetzte Ladungen in der Flüssigkeit und der Elektrode entstehen, die durch die dielektrische Schicht voneinander getrennt sind. Innerhalb des elektrischen Feldes wirken Kräfte zwischen den Ladungsträgern, die als Maxwell-Spannungen an der Oberfläche der Flüssigkeit interpretiert werden können. Um die Spannungen zu kompensieren und das ursprüngliche Kräftegleichgewicht wieder herzustellen, ist eine Verformung der Flüssigkeitsoberfläche nötig, die für einen ausgleichenden Laplace-Druck (2.24) sorgt [54].

2.4.2 Generieren, Transportieren, Teilen und Mischen diskreter Flüssigkeitstropfen

Die beschriebenen physikalischen Grundlagen zur Steuerung des Drucks innerhalb von Flüssigkeiten mittels elektrischer Spannungen können dazu verwendet werden, um unterschiedliche Fluidoperationen anhand diskreter Flüssigkeitstropfen auszuführen. Die einfachste Operation ist der Transport von Flüssigkeiten. Hierbei benetzt der Tropfen eine Elektrode vollständig und überlappt die angrenzenden Elektroden teilweise. Um den Tropfen zu bewegen wird eine der angrenzenden Elektroden unter Spannung gesetzt, sodass nach dem unter Abschnitt 2.3.2 genannten Prinzip ein Druck aufgebaut wird, welcher den Tropfen auf die aktivierte Elektrode befördert (Abb. 2.8 a).

Bei der Tropfen-Teilung ist es notwendig, dass der Tropfen in seiner Ausgangslage eine zentrale Elektrode vollständig benetzt und zudem zwei angrenzende Elektroden teilweise überlappt. Die Teilung vollzieht sich, indem beide teilweise benetzte Elektroden aktiviert sowie die mittlere Elektrode deaktiviert werden. Unter dieser Bedingung werden am rechten und am linken Meniskus Drücke in entgegengesetzten Richtungen aufgebaut, sodass der Tropfen auseinander strebt. Rein optisch laufen die beiden Menisken auf die benachbarten Elektroden zu, während sich der Tropfen über der mittleren Elektrode abschnürt und sich der Tropfenradius an dieser Stelle deutlich verjüngt (Abb. 2.8 b). Sind die verwendeten Spannungen groß genug, kommt es zu einer vollständigen Trennung des Tropfens.

Die Generierung dient dazu, Tropfen aus einem größeren Flüssigkeitsvolumen zu erzeugen. Dabei befindet sich zunächst eine größere Flüssigkeitsmenge innerhalb eines Reservoirs, welches mit einer Elektrode versehen ist, die ein größeres Flüssigkeitsvolumen akkumulieren kann. An dieser Reservoirelektrode ist eine Reihe von weiteren, den Transportelektroden gleichenden Elektroden angeschlossen. Wird ein elektrisches Potential an die Elektrodenreihe angelegt und die Reservoirelektrode abgeschaltet, sorgt die Electrowetting-Kraft sowie die Hydrophobizität des Reservoirs für den Austritt der Flüssigkeit aus dem Reservoir.

Zur Generierung eines diskreten Tropfens wird nach einiger Zeit die Reservoirelektrode wieder eingeschaltet und ein Feld zwischen Reservoir und einer mitt-

leren Generierelektrode abgeschaltet, sodass der gleiche Effekt wie bei der Tropfenteilung eintritt.

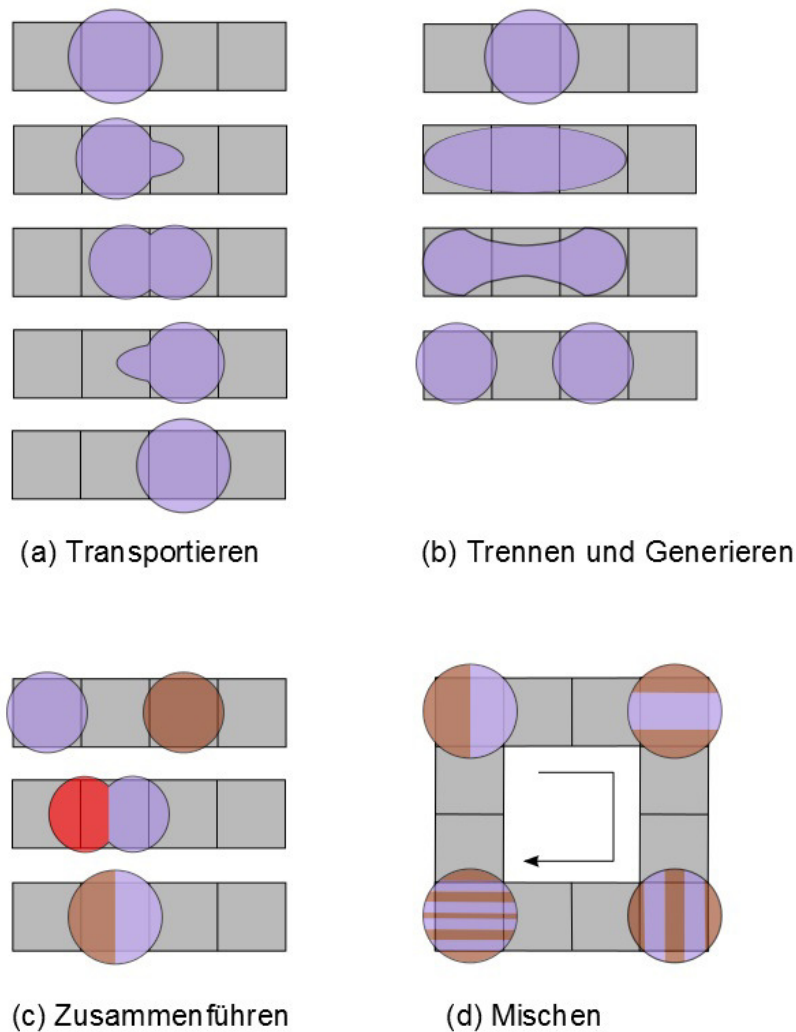


Abbildung 2-8: Darstellung aller relevanten Fluidoperationen, wobei das Transportieren und das Teilen der Flüssigkeitstropfen die Grundlage für alle weiteren Vorgänge bilden.

Das Mischen unterschiedlicher Flüssigkeiten oder Partikel, die sich innerhalb der Flüssigkeiten befinden, ist essenziell für „Lab on a Chip“-Anwendungen. So ist es zum Beispiel bei der Sortierung unterschiedlicher Zellspezies notwendig, eine homogene Verteilung der Zellen innerhalb der Tropfen zu erreichen, um

konstante Bedingungen zu schaffen und schließlich Vorhersagen über die Geschwindigkeit einer Sortierung machen zu können.

Prinzipiell basiert der Mischprozess auf der Diffusion, und es besteht somit eine Abhängigkeit zwischen der Geschwindigkeit des Mischvorganges und der Grenzfläche zwischen den Flüssigkeitstropfen. Grundsätzlich ist es demnach vorteilhaft, die gemeinsame Grenzfläche zwischen den Flüssigkeiten zu maximieren, um den Diffusionsvorgang zu beschleunigen. Hauptsächlich werden drei unterschiedliche Strategien zur Durchmischung von Flüssigkeiten angewendet. Eine Methode besteht darin, Flüssigkeitstropfen auf einer Reihe von Elektroden vor und zurück zu bewegen. Die gleiche Elektrodenanordnung kann ebenfalls dazu genutzt werden, einen Tropfen kontinuierlich zu teilen und wieder zusammenzuführen und somit die Diffusion zu fördern. Das dritte Prinzip erfordert einen Ring aus Elektroden, auf dem die Tropfen in kreisenden Bewegungen geführt werden (Abb. 2.8 d) [55].

3 Konzept der Zellsortieranlage

Das Konzept der Mikrochip-navigierten Zellsortieranlage beruht im Gegensatz zur Technik der Durchflusszytometrie auf einer parallelen Zellsortierung. Flüssigkeitstropfen mit unterschiedlichen Partikel- oder Zellespezies werden auf einem Mikrochip transportiert und geteilt, bis die einzelnen Populationen voneinander getrennt vorliegen. Dabei werden der Transport und die Teilung auf

einem digitalen mikrofluidischen Chip ausgeführt, während die Diskriminierung der Partikel oder der Zellen ein Fluoreszenzmikroskop leistet. Ein Sortieralgorithmus entscheidet auf der Grundlage der Fluoreszenzsignale, welche Fluidoperationen ausgeführt werden. Eine Integration aller Komponenten zu einem Messzyklus ermöglicht eine automatisierte Zellsortierung.

3.1 Struktur des Sortieralgorithmus

Der Sortieralgorithmus bildet die Vorlage für das anzufertigende Elektrodenarray. Das Konzept wurde von dem Fachbereich Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE) der Universität Duisburg-Essen in Anlehnung an Logistik-Netzwerke, Postverteilzentren oder auch Bereiche aus dem Transport und Verkehr entwickelt. Für die Modellierung und Optimierung der Sortierarchitekturen und Algorithmen wurde eine Simulationsplattform in MATLAB erzeugt und die Zeitkonstanten mittels fluiddynamischer Simulationen (CFD) mit Hilfe von COMSOL Multiphysics numerisch ermittelt. Das softwaretechnisch umzusetzende Problem der Mikrochip-navigierten Zellsortierung beinhaltete eine Bearbeitung zellhaltiger Tröpfchen durch Transportvorgänge, mehrfache Teilungssequenzen sowie intermediäre Analyse und Verdünnungsschritte, bis die Auftrittswahrscheinlichkeit eines isolierten Zelltyps in einem Tröpfchen ausreichend groß war. Die Simulationen der Sortierung erfolgte durch die entwickelte Programmierumgebung, deren Struktur der matrixförmigen Elektrodenanordnung auf dem Mikrochip entsprach und die eine raumdiskrete Überführung der Tropfen in eine Simulationsmatrix ermöglichte. Weiterhin wurden jedem Tröpfchen Daten wie das Volumen oder die Anzahl der entsprechenden Zelltypen zugeordnet. Die Dynamik der Zellverteilungen in den Tropfen konnte somit bei unterschiedlichen Sortierarchitekturen und Elektrodenschaltungen anhand der zeitlich fortschreitenden Simulationsmatrizen simuliert werden. In diesem Zusammenhang wurden die Fluidoperationen und die Fluoreszenzanalyse als vorgefertigte Funktionsblöcke (Operatoren) im Programm implementiert. Die Kombination mehrerer Funktionsblöcke ergab eine Sortierarchitektur mit entsprechendem Sortieralgorithmus, der die Schaltung der Elektroden durch Einträge in die Simulationsmatrix steuerte. Eine Herausforderung beinhaltete der

Teilungs- und Analyseoperator, da sich bei dieser Operation das Volumen und die Zellzusammensetzung eines Tröpfchens änderten. Die Funktion der Partikelverteilung wurde aus diesem Grund durch ein volumenproportionales statistisches Modell ermittelt, dem die Verwendung einer hypergeometrischen Verteilung zugrunde lag. Anhand der beschriebenen Simulationsplattform wurden unterschiedliche Architekturen simuliert. Erste Versuche fanden anhand von binären Sortierbäumen statt, die entweder linear (Bahnsorter) oder ringförmig (orbikularer Sorter) angeordnet wurden. Es zeigte sich, dass bei suboptimalen Zellgemischen mit einem Verhältnis von 1:1 der Bahnsorter eine Sortiergeschwindigkeit von 0,2 Zellen/Takt aufwies und der orbikulare Sorter 0,3 Zellen/Takt virtuell aussortierte. Der als Prototyp verwendete 2-3 Sequenzteiler-Sorter besteht aus zwei schnell aufeinander folgenden Teilungssequenzen, um die Zellen voneinander zu trennen. Im ersten Schritt erfolgt eine Teilung des Tropfens in zwei Teile, gefolgt von einer zweiten Separierung in drei Segmente. Durch die Zuführung von Pufferlösung wird das Volumen der Tropfen konstant gehalten. Liegen die Zellspezies nach den Teilungen isoliert voneinander vor, werden die Tropfen durch eine entsprechende Abfuhr-Logistik aus dem System entfernt. Kann keine vollständige Vereinzelung erreicht werden, wird der Tropfen in das Reservoir zurück transportiert und steht für eine erneuten Sortierung zur Verfügung. Je nach Zellkonzentration und Anteil gesuchter Zellen im Ausgangstropfen ermöglicht das Sortierkonzept Sortiergeschwindigkeiten von 0,6 bis 1,85 Zellen/Takt. Zudem weist es eine hohe Robustheit gegenüber der Gesamtzellkonzentration auf, die als Sättigungsgrenze auftritt. Ein zukünftiges Sortiermodell könnte der Smart-Diffusion-Sorter darstellen. Das Konzept beinhaltet keine Verdünnungs- und Mischprozesse, sondern eine Folge direkter Zweiteilungen und eine großräumige Tropfen-Abfuhrlogistik, die auf verkehrsabhängigen lokalen Entscheidungen beruht. Die Vermeidung der zeitintensiven Verdünnungsprozesse bedingt eine Anpassung der Elektrodendimensionen zur Aufrechterhaltung des Fluidhandlings. Die Sortiergeschwindigkeit befand sich bei der Simulation in einem Bereich von 1,5 und 5 Zellen/Takt, wobei eine starke Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration und von dem Verhältnis der Zellspezies untereinander vorlag. Die Nachteile des Sorters bestehen in der hohen Komplexität des Algorithmus und in der großen Anzahl an Elektroden, die

zu diesem Zeitpunkt die technologische Umsetzung des Modells in einen Sortierchip verhindern [56].

3.2 Aufbau des Mikrochips

Grundsätzlich besteht der Mikrochip aus 3 Metallebenen, die durch Kontakte (Vias) miteinander verbunden sind (Abb 3-5). Mit Hilfe dieses Schichtaufbaus ließ sich ein Elektrodenarray mit 456 Elektroden auf einem Siliziumwafer strukturieren.

Die beiden untersten Metallschichten (Mtl. 3 und Mtl. 4) bilden das Substrat für die Leiterbahnen, die von den Kontaktpads zu den Elektroden verlaufen und diese mit Strom versorgen. Die Kontaktpads sind quadratisch um die Elektroden herum angeordnet, wobei jede Seite des Quadrates 156 Elektroden beinhaltet. Insgesamt weist der Chip eine Fläche von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ auf.

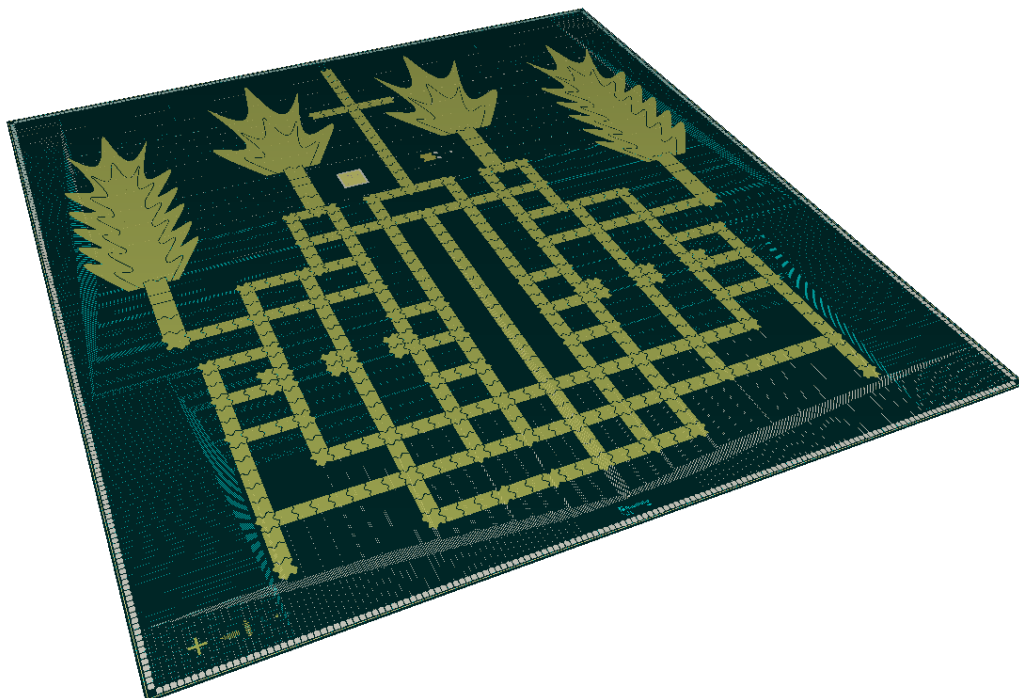


Abbildung 3-1: Modell des Siliziumchips inklusive des Elektrodenarrays.

Die Elektroden bestehen aus der obersten Metallebene (Mtl. 5). Die Kontakte zwischen den Ebenen Mtl. 3 und Mtl. 4 werden als Via 3 bezeichnet, während die Verbindungen zwischen Mtl. 4 und Mtl. 5 die Bezeichnung Via 4 tragen.

Die Anordnung der 456 Elektroden auf dem Mikrochip basiert auf dem zuvor beschriebenen Sortieralgorithmus [57]. Allgemein lassen sich 3 Elektrodentypen voneinander unterscheiden. Es gibt die Transportelektroden, die für den Transport der Flüssigkeitstropfen zwischen den Teilungsstationen und für die Tropfenteilung selbst verantwortlich sind. Ihre Größe beträgt $350 \times 350 \mu\text{m}^2$. Sie sind über splineförmige Kanten miteinander verbunden.

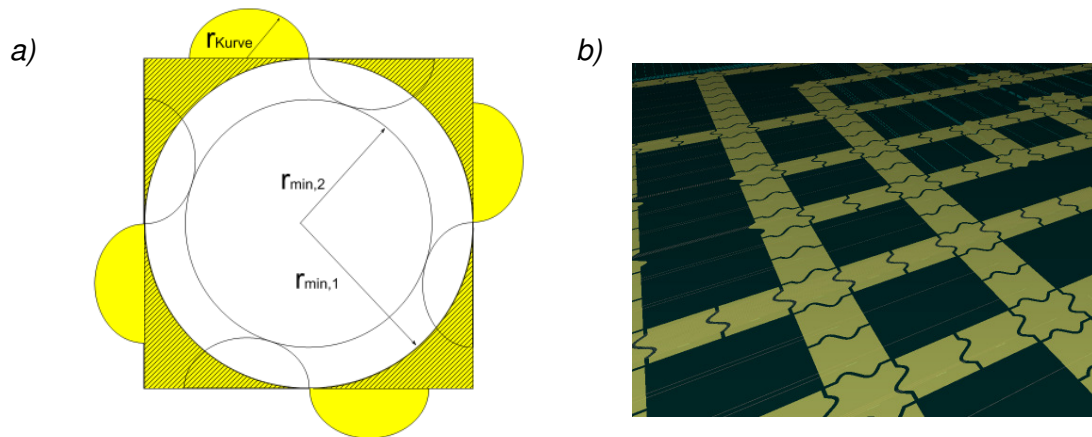


Abbildung 3-2: a) Schematische Zeichnung der Transportelektrode. Die Radien $r_{\min,1}$ und $r_{\min,2}$ beschreiben die Radien der minimalen Tropfengrößen, die mit einer Elektrode mit einer geraden Kante (schraffierter Bereich) oder mit einer splineförmigen Elektrode (gelber Bereich und weiße Aussparung) noch transportiert werden können. b) $350 \times 350 \mu\text{m}^2$ große Transportelektroden auf dem Layout des Mikrochips.

Der Vorteil der Spline-Form gegenüber einer geraden Kante liegt in der Überlappung der beiden Elektroden, die es ermöglicht, auch kleinere oder zu klein generierte Tropfen zu transportieren. In diesem Zusammenhang spielen die elektrischen Felder eine wichtige Rolle. Sie befinden sich vor allem über der Elektrodenfläche, während die elektrische Feldstärke nur wenige Mikrometer außerhalb der Elektrode stark abfällt. Das bedeutet für einen Tropfen, der nicht auf die benachbarte Elektrode überlappt, dass dieser nicht im Kontakt mit dem elektrischen Feld steht und somit auch nicht transportiert werden kann. Die splineförmige Verbindung ermöglicht es, dass ein Teil der Nachbarelektrode

und somit auch das damit verbundene elektrische Feld in den Bereich der Tropfen führenden Elektrode eindringt. Ein nicht überlappender Tropfen stünde somit ebenfalls in Kontakt mit dem elektrischen Feld der Nachbarelektrode und könnte bewegt werden. Abbildung 3-2 a verdeutlicht diesen Sachverhalt.

Elektroden mit geraden Kanten (schraffierter Bereich) benötigen Tropfen mit dem Radius $r_{\min 1}$ auf ihrer Oberfläche für einen Transport des Tropfens auf die Nachbarelektrode, da das benachbarte Feld sich ebenfalls nur im Bereich des genannten Radius befindet. Hingegen tritt das benachbarte Feld bei Elektroden mit splineförmigen Elektroden (gelber Bereich, weiße Aussparungen) schon ab dem Bereich $r_{\min 2}$ auf, sodass in diesem Fall auch Tropfen mit dem Radius $r_{\min 2}$ transportiert werden können [58]. Unter der Berücksichtigung, dass die Höhe des Spacer 30 μm und die Kantenlänge einer quadratischen Elektrode 350 μm beträgt, lässt sich das zu transportierende Volumen eines Tropfens als ca. 5,7 nl angeben.

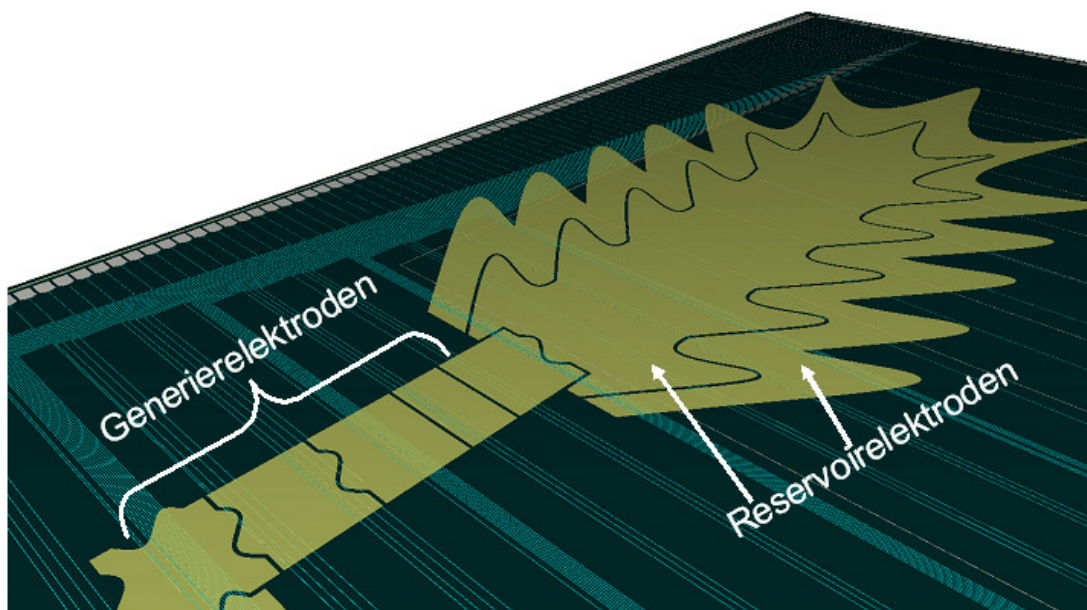


Abbildung 3-3: Schematische Zeichnung der Reservoir- und Generierelektroden. Die beiden Reservoir Elektroden besitzen eine fingerförmige Struktur. Es folgen fünf Generierelektroden, welche für die Tropfenextraktion verantwortlich sind. Die kürzere Generierelektrode wird als Trennelektrode bezeichnet.

Neben den Transportelektroden spielen die Reservoirelektroden und Generierelektroden eine wichtige Rolle bei dem Konzept der Zellsortierung (Abb. 3-3). Die Reservoirelektroden sind große fingerförmige Elektroden, die vor allem das Flüssigkeitsvolumen innerhalb des Reservoirs steuern. Ist eine Spannung angelegt, besitzen sie einen hydrophileren Charakter als im abgeschalteten Zustand, und größere Flüssigkeitsmengen können auf der gesamten Elektrode ortsgebunden gespeichert werden. Die an die Reservoirelektroden angeschlossenen Generierelektroden verbinden das Reservoir mit den Transportelektroden. Ihre Größe beträgt $525 \times 525 \mu\text{m}^2$, und sie sind damit größer als die Transportelektroden. Der Grund für diese Größendifferenz liegt in der Notwendigkeit, die Tropfen für eine Zellsortierung teilen zu müssen. Zunächst werden durch die größeren Elektroden größere Tropfen generiert, die nach einer Teilung, ohne dass das Volumen aufgefüllt werden müsste, weiter transportiert werden können. Eine besondere Stellung nimmt die Trennelektrode ein. Ihre Fläche beträgt ca. $525 \times 250 \mu\text{m}^2$, und sie ist unter anderem für die Trennung des Tropfens von der Flüssigkeit im Reservoir verantwortlich. Allgemein findet eine Tropfengenerierung statt, indem die Reservoirelektroden zunächst abgeschaltet und die angrenzenden Generierelektroden aktiviert werden. In diesem Fall wird eine von der Spannung und Pulsdauer abhängige Menge der Flüssigkeit auf die Generierelektroden befördert, ohne den Kontakt mit der Flüssigkeit im Reservoir zu verlieren. Im nächsten Schritt sorgt eine Deaktivierung der Trennelektrode bei gleichzeitiger Aktivierung der Reservoir- und Generierelektroden für die Trennung des Flüssigkeitsvolumens, wodurch ein Tropfen entsteht. Sämtliche Elektrodentypen befinden sich in einem Abstand von $20 \mu\text{m}$ zueinander. Um die einzelnen Elektroden ansteuern zu können, gehört zu jeder Elektrode ein durch eine Zuleitung verbundenes Kontaktpad, welches wiederum über einen Draht mit einer Leiterplatte verbunden ist. Die Leiterbahnen besitzen eine Breite von $3 \mu\text{m}$ und einen minimalen Abstand von $8 \mu\text{m}$ zueinander. Zudem liegen sie in den Ebenen Mtl.3 oder Mtl.4, wodurch eine Kreuzung einzelner Bahnen ermöglicht wird, ohne einen Kurzschluss zu erzeugen. Die Option, einzelne Leiterbahnen übereinander laufen zu lassen, musste aufgrund der hohen Anzahl an Elektroden gewählt werden.

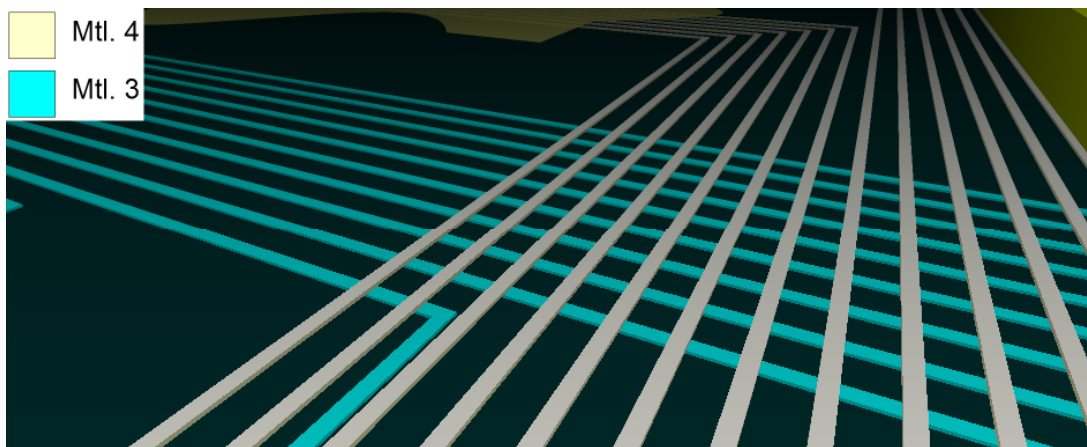


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung des Verlaufs der Leiterbahnen in unterschiedlichen Metallebenen. Durch die Herstellung der Bahnen in unterschiedlichen Metallebenen (Mtl. 3, Mtl. 4) konnten Kreuzungspunkte ohne die Gefahr von Kurzschlüssen erzeugt werden.

Von den Metallflächen der Kontaktpads verlaufen die Leiterbahnen weiter zu den Elektroden. Anhand der Abbildung 3-5 wird deutlich, dass die Ebene der stromführenden Leiterbahn durch die Verbindung mit dem Kontaktpad ausgewählt wird.

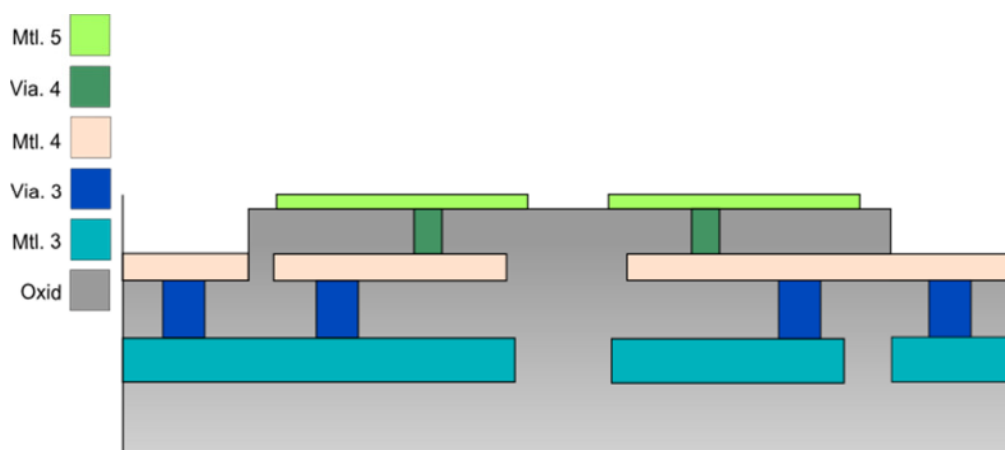


Abbildung 3-5: Darstellung der einzelnen Ebenen innerhalb des Mikrochips. Die Kontaktpads befinden sich an den Außenseiten und erstrecken sich über zwei Metallebenen. Somit können auch die Leiterbahnen in unterschiedlichen Ebenen angeschlossen werden und sich gegebenenfalls schneiden, ohne falsche Signale zu erzeugen.

An den Elektroden befindet sich ein Kontakt, um die Leiterbahnen anzuschließen. Der Kontakt besteht aus den Ebenen Mtl. 3, Via 3 und Mtl. 4 und wird durch das Via 4 mit der in Mtl. 5 liegenden Elektrode verbunden. Die Länge beträgt $60\text{ }\mu\text{m}$ und die Breite entspricht der Breite einer Leiterbahn ($3\text{ }\mu\text{m}$). Beide Via-Sorten (Via 3, Via 4) sind mit einer Anzahl von 10 Kontakten vertreten, wobei der Abstand zwischen den Vias 3 $4,5\text{ }\mu\text{m}$ und die Distanz zwischen den Vias 4 $5\text{ }\mu\text{m}$ beträgt. Die Abbildung 3-6 zeigt einen Querschnitt des Kontaktes. Zu erkennen ist, dass durch den mehrlagigen Aufbau die Möglichkeit besteht, die Leiterbahnen (Mtl. 3, Mtl. 4) mit der Elektrode zu verbinden (Mtl. 5).

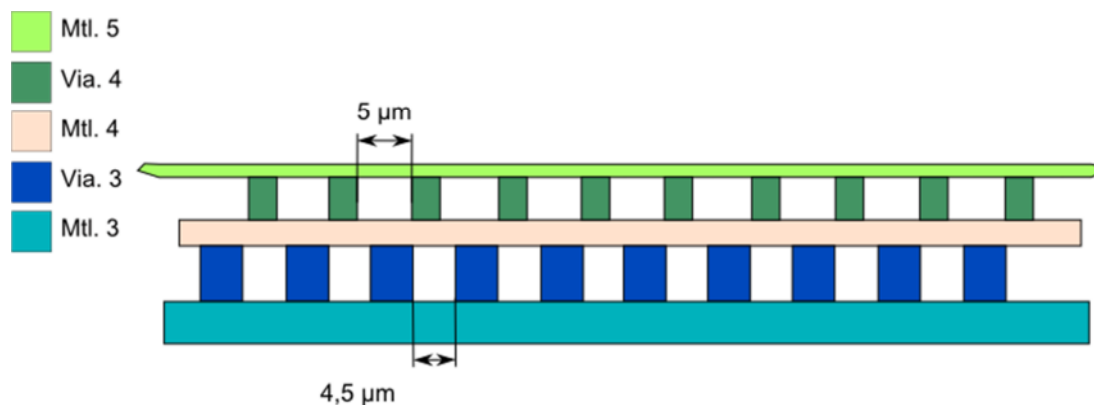


Abbildung 3-6: Zeichnung eines Querschnitts durch einen Elektrodenkontakt. Die Metalllagen Mtl. 5 und Mtl. 4 werden durch das Via 4 miteinander verbunden, während die Metallebenen Mtl. 4 und Mtl. 3 durch das Via 3 miteinander kontaktiert werden.

3.3 Konstruktion der Mikrofluidik

Auf dem Mikrochip wurde ein Spacer aus SU-8 Lack aufgebracht, der zusammen mit einem Glasdeckel die Mikrofluidik bilden sollte (Abb. 3-7).

Der Spacer umgibt das gesamte Elektrodenarray und formt zudem die Reservoir. Er schließt die Reservoir Elektroden ein, sodass diese nur an der Stelle der Generierelektroden mit dem übrigen Chip verbunden sind. Insgesamt gibt es vier Reservoir, wobei die beiden inneren Reservoir das Probenmaterial führen und die beiden äußeren Speicher lediglich Pufferlösung zur Auffüllung der

Tropfen nach der Tropfenteilung beinhalten sollen. Eine Besonderheit der inneren Reservoirs ist eine zusätzliche Aussparung zur Rückführung von nicht vollständig sortierten Tropfen. Dadurch soll eine Option geschaffen werden, die es dem Betreiber erlaubt, die Tropfen zurückzuführen und erneut durch die Teilungsstationen laufen zu lassen. Der minimale Abstand zwischen dem Spacer und den Pads beträgt ca. 25 μm , wodurch die Toleranz bei der Justierung des Deckels auch nur in diesem Bereich liegen darf. Die Höhe des Lackrahmens wurde auf 30 μm festgelegt.

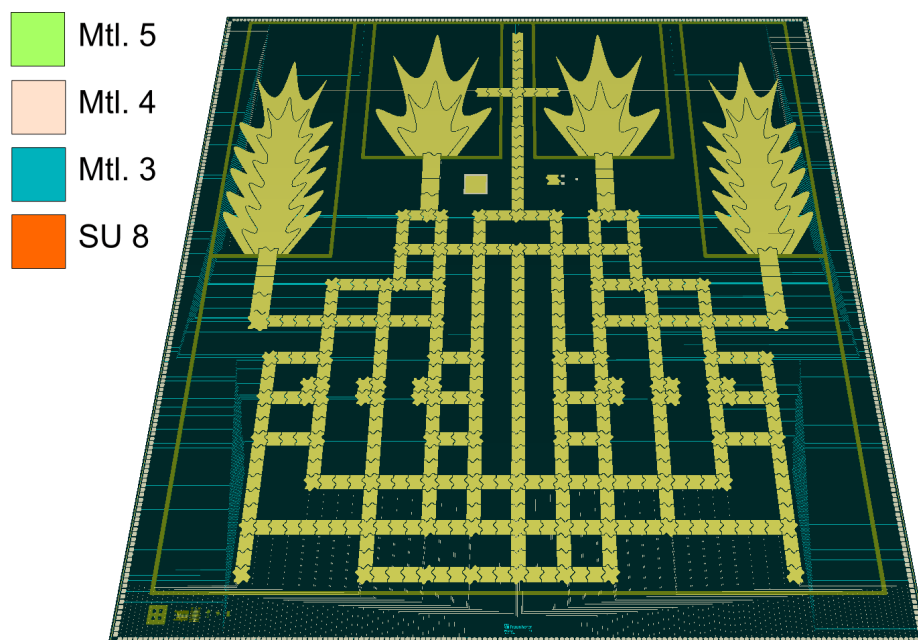


Abbildung 3-7: Modell des Siliziumchips inklusive aufgebrachtem SU-8 Spacer. Der Lackrahmen formt insgesamt vier Reservoirs und umgibt das komplette Elektrodenarray (sichtbar als dünne grüne Linie).

Weiterhin befinden sich auf dem Chip verschiedene Justiermarken (Abb. 3-8). Sie dienen dazu, die Belichtungsgeräte innerhalb der lithografischen Lackstrukturierung auszurichten. Außerdem sind Nonien und CD-Strukturen (Critical Dimension) vorhanden, um die Güte der SU-8 Strukturierung zu bestimmen.



Abbildung 3-8: Schematische Darstellung einer Justiermarke und einiger Strukturen zur Bestimmung der Genauigkeit der Spacer-Justierung.

Der Deckel der Mikrofluidik besteht aus Glas und ist zudem mit einer leitfähigen ITO-Schicht versehen (Abb. 3-9).

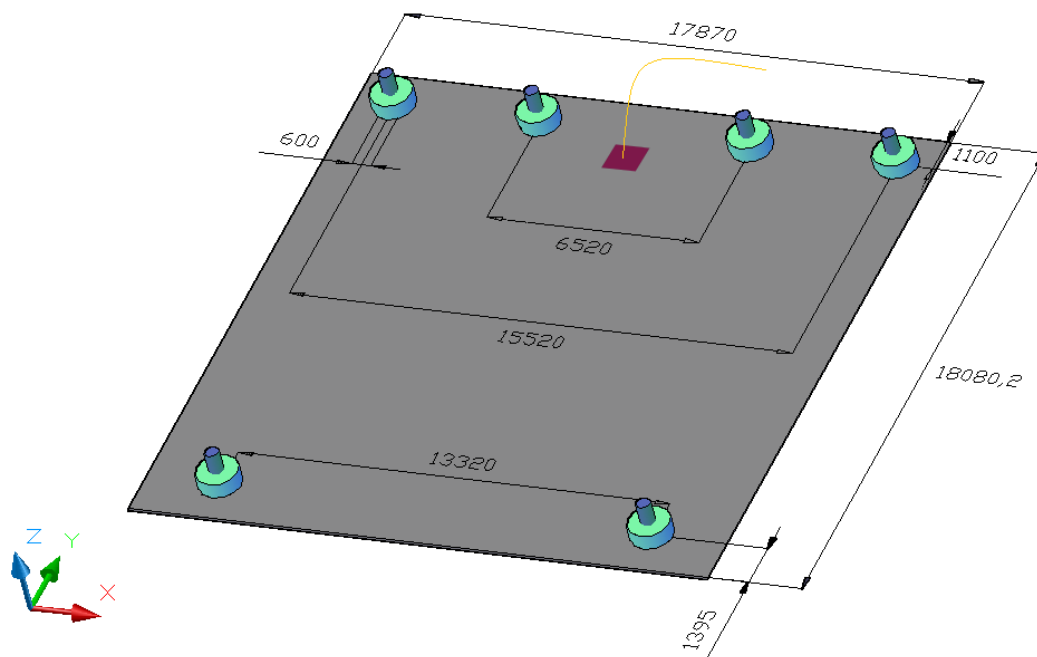


Abbildung 3-9: Zeichnung des Glasdeckels inklusive Verbindungsvorrichtungen, die einen Flüssigkeitsaustausch ermöglichen. Durch einen mit leitfähigem Kleber angebrachten Draht wird der Deckel kontaktiert.

Weiterhin befindet sich über der ITO-Schicht eine hydrophobe Teflonschicht. Um die Reservoirs zu befüllen und die sortierten Zellen aus dem Chip zu entfernen, befinden sich im Deckel Bohrungen mit einem Durchmesser von 600 μm . Über den Löchern sind Schlauchscheiben aufgeklebt, in denen sich konzentrisch angeordnete Kapillaren befinden. Diese Verbindungsstücke ermöglichen es, Kunststoffschläuche an den Chip anzuschließen und somit Flüssigkeiten zu- und abzuführen. Die Verbindung des Deckels mit der Leiterplatte erfolgt über einen Draht, der mit leitfähigem Kleber auf der Oberseite des Deckels befestigt ist. Der Klebstoff verläuft von der Oberseite zur Unterseite des Deckels und stellt einen Kontakt von der Leiterplatte bis zur ITO-Schicht her.

Durch Aufsetzen auf den SU-8 Spacer und eine Fixierung des Deckels mit Hilfe einer Vergussmasse konnte ein mikrofluidisches System über dem Elektrodenarray hergestellt werden.

3.4 Ansteuerung und Nutzung des Mikrochips als Sortieranlage

Die Nutzung des Mikrochips als Sortieranlage erfordert eine separate Ansteuerung sämtlicher Elektroden, die Detektion fluoreszierender Zellen auf dem gesamten Chip und eine Synchronisation beider Funktionen.

Der EWOD-Chip lässt sich durch zwei unterschiedliche Programme ansteuern. Zum einen kann ein LabVIEW-Programm genutzt werden (Bartels Mikrotechnik GmbH), während die alternative Software auf der Programmiersprache C# basiert (Fraunhofer IMS). Beide Programme ermöglichen es, einen Mikrocontroller über eine serielle Schnittstelle anzusprechen und somit Spannungen an einzelne Elektroden anzulegen. Die Spannungen werden, je nach Experiment, von einem USB-Anschluss oder von einem Funktionsgenerator bereitgestellt. Als Spannungspulse werden modulierte Gleichspannungen oder rechteckförmige Wechselspannungen verwendet, um die Elektrolyse an den Elektrodenoberflächen zu vermeiden. Für die Zellsortierung auf dem gesamten Chip wird schließlich eine Wechselspannung genutzt, die von einem Funktionsgenerator erzeugt wird. Die Entscheidung, an welche Elektrode die Spannung gelangt, wird durch das C# basierte Programm übernommen. Es bedient einen Mikrocontroller, der 16 32-Bit-Schieberegister (Abb. 3-10) ansteuert, wobei an jedem Schieberegis-

ter wiederum 32 Endstufen angeschlossen sind (Abb. 3-11 a). Da jede Endstufe eine Elektrode auf dem Chip regeln kann, besitzt die Ansteuerung die Möglichkeit, maximal 512 Elektroden separat zu kontrollieren.

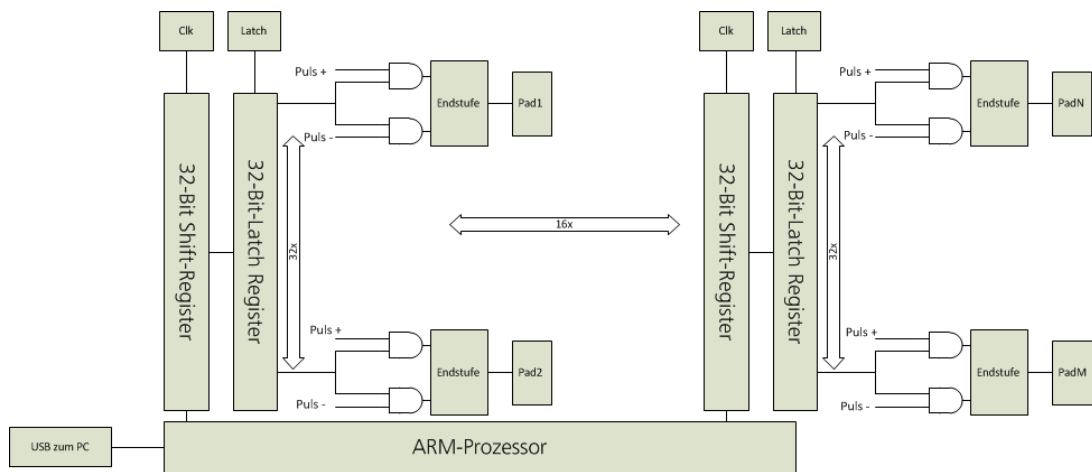


Abbildung 3-10: Prinzip der Ansteuerung des Funktionsmuster 2. Ein Mikrocontroller kontrolliert Schieberegister, die wiederum über Endstufen mit den Elektroden auf dem Chip verbunden sind.

Die erzeugten Spannungen werden über Flachbandkabel zu einer Verteilerplatine geführt (Abb. 3-11 b), die durch Draht-Bonden mit den einzelnen Kontaktpads verbunden ist und für die Übertragung der Signale auf den Chip sorgt.

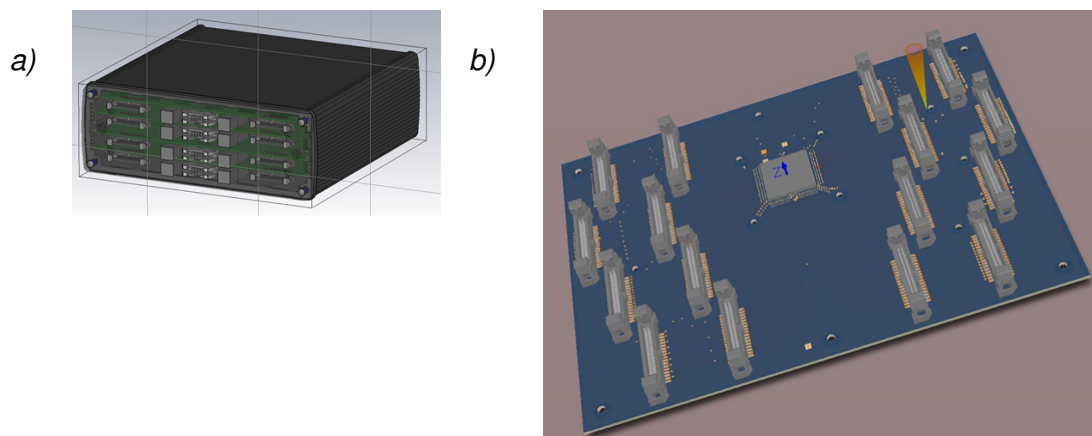


Abbildung 3-11: a) Ansteuerung inklusive der Mikrocontroller b) Chipträger-Platine mit Adaptern für die Anschlüsse von Flachbandkabeln (Fraunhofer IMS)

Zur Betrachtung der Chipoberfläche sowie zur Anregung und Aufnahme von Fluoreszenzsignalen wird ein Fluoreszenzmikroskop (Axio Zoom.V16) mit montierter CCD-Kamera und angeschlossener Quecksilberdampflampe verwendet. Es ermöglicht eine Betrachtung des vollständigen Chips ($2 \times 2 \text{ cm}^2$) bei gleichzeitiger Auflösung einzelner fluoreszierender Zellen oder Partikel mit einem minimalen Durchmesser von zehn Mikrometern. Das Mikroskop besitzt einen Filterrevolver, in den vier Filtersätze gleichzeitig integriert werden können. Ein Filtersatz besteht aus einem Anregungsfilter, einem Strahlteiler und einem Emissionsfilter und ist somit spezifisch für einen bestimmten Fluoreszenzmarker. Um eine Zellsortierung auszuführen, ist es notwendig, dass die Ansteuerung der Elektroden und die Fluoreszenzerkennung miteinander gekoppelt werden, sodass ein automatischer Sortierzyklus entsteht (Abb. 3-11).

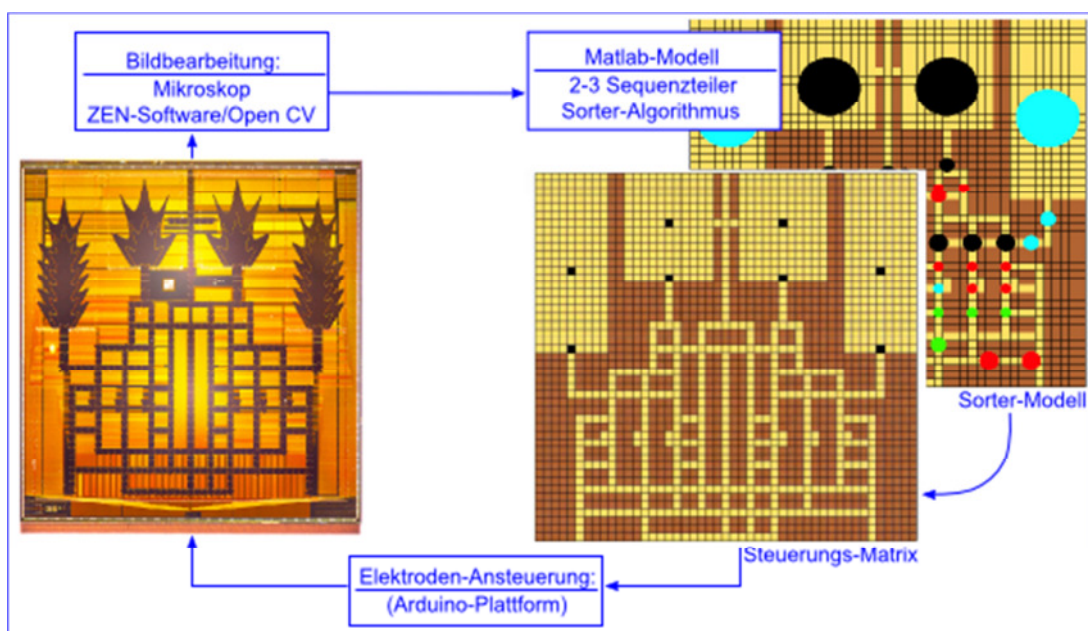


Abbildung 3-12: Ablauf-Diagramm eines Sortierzyklus [57]. Nach der Aufnahme eines Fluoreszenzbildes entscheidet ein Sortierzyklus über die folgende Beschaltung der Elektroden und damit über die anschließenden Fluidoperationen.

Zu Beginn eines Messzyklus erfolgt die Aufnahme eines zweikanaligen Fluoreszenzbildes des Mikrochips und die Bestimmung der zellulären Zusammensetzung der Flüssigkeitstropfen. Auf der Grundlage des Fluoreszenzbildes legt ein

Sortieralgorithmus (Universität Duisburg-Essen, Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE)) [57] die anzusteuern Elektroden fest und übermittelt diese Informationen an die Steuer-Hardware, welche die relevanten Fluidoperationen auf dem Chip ausführt. Der Informationstransfer basiert auf Matrizen, welche die Elektrodenmatrix und die Position der einzelnen Tropfen kodieren.

4 Evaluierung optischer Systeme

In diesem Abschnitt werden der Aufbau des Messplatzes und die damit verbundenen Anforderungen an das optische System zur Messung der Fluoreszenzsignale betrachtet. Zunächst wird eine theoretische Methode zur Abschätzung der Photonenausbeute vorgestellt und auf unterschiedliche Messsysteme angewendet. Weiterhin wurden Experimente mit geeignetem Probenmaterial an unterschiedlichen Messständen durchgeführt und auf dieser Grundlage ein System zur Untersuchung des EWOD-Chips ausgewählt.

4.1 Abschätzung der Photoelektronenausbeute

Ein zentraler Punkt bezüglich des Aufbaus des Messstandes ist das verwendete optische System zur Detektion der fluoreszierenden Partikel und Zellen. Hierbei spielt vor allem die Intensität der anregenden Lichtquelle und die Sensitivität

des aufnehmenden Gerätes eine wesentliche Rolle für die Geschwindigkeit, mit der eine Zellsortierung potentiell abläuft. Unter der Berücksichtigung, dass sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Intensität der anregenden Strahlung verhält, ist es verständlich, dass Partikel, die Lichtquellen mit hohen Strahlungsintensitäten ausgesetzt sind, eine geringere Expositionszeit benötigen, um eine bestimmte Fluoreszenzstrahlung zu emittieren, als Partikel, die einer Strahlungsquelle mit niedriger Intensität ausgesetzt sind. Außerdem benötigen sensitive Kameras mit hohen Bildraten nur sehr kurze Integrationszeiten, um fluoreszierende Partikel abzubilden. Eine Kombination aus einer leistungsstarken Lichtquelle und einer sensitiven Kamera ermöglicht somit eine schnelle Bildaufnahme und unterstützt die Geschwindigkeit der Zellsortierung in positiver Weise. Die Auswirkung unterschiedlicher Anregungsquellen auf das Signal des Photodetektors kann in Anlehnung an Neukammer et al. mit Hilfe der am Detektor generierten Photoelektronen (Φ) pro Zeit wie folgt berechnet werden [59]

$$\frac{d\Phi}{dt} = \frac{d\Omega}{4\pi} \eta \sigma_{\text{abs}} N_{\text{Fl}} \frac{I_0}{h\nu} T_0 \text{QE} \frac{1}{1 + \left(\frac{I_0}{I_{\text{sat}}}\right)} \quad (4.1)$$

In diesem Zusammenhang steht Φ für die Anzahl der Photoelektronen, welche aufgrund des inneren photoelektrischen Effektes am CCD Sensor generiert werden. Es wurde beispielhaft die Photoelektronenausbeute für ein mit dem Fluorophor EGFP bestückten Partikel berechnet. Der Ausdruck $d\Omega/4\pi$ gibt dabei ein Raumwinkelement des Detektors an und besitzt einen Wert von 7×10^{-3} . Das Formelzeichen η beschreibt die Quanteneffizienz des Fluorophors, die mit einem Betrag von 0,6 in die Formel eingeht. Der aus dem molaren Extinktionskoeffizienten ($55000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) [60] berechnete Absorptionskoeffizient σ_{abs} besitzt die Größe $2 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$. Weiterhin wird die Anzahl der Fluorophore (N_{Fl}), die sich auf einem Partikel befinden, auf einen Wert von 10000 festgelegt. Der Parameter I_0 , der die eingestrahelte Energie beschreibt, berechnet sich aus der Leistung des Lasers. Bei den CW-Lasern liegt der Wert der Bestrahlungsstärke zwischen 0,25 und 2,5 W/cm². Für die gepulsten Laser wurden Leistungsdichten eingesetzt, mit denen die Fluoreszenz-Sättigungsleistung der Fluorophore (10000 W) deutlich überschritten wurde. Das Produkt $h\nu$ gibt die

Energie eines Photons an. Zusätzlich fließen in die Gleichung ein Transmissionsfaktor T_0 mit der Größe 0,5 und die Quanteneffizienz der Kamera QE mit einem Wert von 0,7 ein. Der Term $1 / [1 + (I_0 / I_{\text{sat}})]$ beschreibt das Sättigungsverhalten der Fluoreszenzanregung. Für den Fall $I_0 \ll I_{\text{sat}}$ entspricht das Ergebnis des Ausdrucks ≈ 1 , sodass keine Sättigung der Fluoreszenzemission eintritt. Bei höheren Laserleistungen gilt $I_0 \gg I_{\text{sat}}$ und der Term wird kleiner als 1. Er kompensiert somit die eingestrahelte Laserleistung und verursacht ein Sättigungsverhalten der Fluoreszenzemission.

Die Beurteilung unterschiedlicher Lasersysteme anhand der Gleichung 4.1 beinhaltet zunächst einen grundsätzlichen Vergleich zwischen gepulsten Lasern und dauerhaft betriebenen CW-Lasern bezüglich ihrer Fähigkeit, Photoelektronen bei einer bestimmten Taktung des Sortierexperimentes zu erzeugen. Die Taktungen der Experimente betrugen 10 Hz und 100 Hz. Das bedeutete, dass zunächst innerhalb dieser Zeit die Fluoreszenzanregung stattfand und daraufhin ein Sortierschritt folgte. Es wurde angenommen, dass der CW-Laser während des gesamten Zeitraums Licht emittiert, während die gepulsten Laser kurze hochenergetische Pulse mit Pulslängen im Bereich von Nanosekunden abgeben, die ebenfalls einer bestimmten Taktung unterliegen (10 Hz, 1000 Hz).

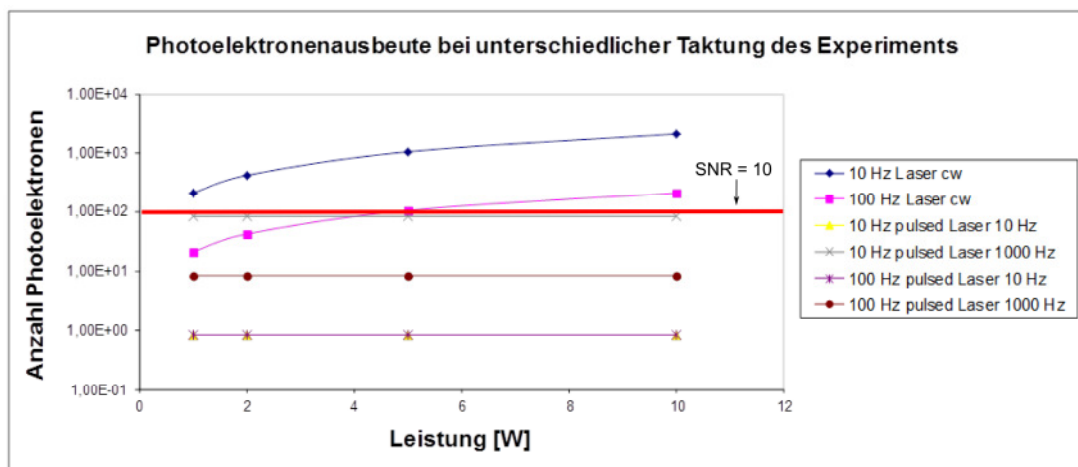


Abbildung 4-1: Abschätzung der Anzahl emittierter Photoelektronen, die bei einer Anregung durch unterschiedlich betriebene Laser erzeugt werden. Betrachtet werden Expositionszeiten von 0,1 s bis 0,01 s (siehe Legende vordere Kennzahl), was einer Taktung des Sortierexperimentes im Bereich von 10 Hz bis 100 Hz entspricht. Die Betriebsart des Lasers entspricht der hinteren Kennzahl.

Wird die Anzahl der Fluorophore als konstant angenommen und innerhalb des experimentellen Aufbaus lediglich die Laserleistung variiert, ergibt sich die Anzahl der generierten Photoelektronen am Photodetektor (Φt) in Abhängigkeit von der Leistung der einstrahlenden Lichtquelle (Abb. 4.1). Das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) der Kamera kann durch den Ausdruck 4.2 dargestellt werden und repräsentiert das Verhältnis des gemessenen Signals (Φt) zum auftretenden Rauschen. Das Rauschen besteht aus einem Photonenrauschen ($\sqrt{\Phi t}$), das sich aus einer natürlichen statistischen Variation des einfallenden Photonenflusses ergibt und aus einem vernachlässigbaren Dunkelstrom-Rauschen ($N_d t$), welches durch thermisch generierte Elektronen verursacht wird [61]. Die zur Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses verwendeten Größen beziehen sich auf die Anzahl der auftretenden Ladungsträger und sind daher dimensionslos.

$$SNR = \frac{\Phi t}{\sqrt{\Phi t + N_d t}} \quad (4.2)$$

Obwohl die gepulst betriebenen Laser eine höhere Leistungsdichte erzeugen können, zeigen die Berechnungen, dass mit kontinuierlich betriebenen Lasern (CW) und bei einer entsprechenden Taktung der Experimente die höchste Anzahl an Photoelektronen erzeugt werden kann. Dieses Verhalten lässt sich durch das Sättigungsverhalten der Fluorophore erklären. Innerhalb der experimentell vorgegebenen Expositionszeit gibt ein gepulster Laser mehrere hochenergetische Pulse ab. Jedoch wird aufgrund der Sättigung nicht die gesamte Energie der Pulse genutzt, um Photonen zu erzeugen. Im Gegensatz dazu liegt die Leistungsdichte der CW-Laser zwar unterhalb der Sättigungsleistung der Fluorophore, aber es können während der gesamten Expositionszeit Photoelektronen generiert werden. Die Möglichkeit der CW-Laser, kontinuierlich die Fluoreszenz anzuregen, kann somit den Nachteil der geringeren Leistungsdichte kompensieren. Während der weiteren Betrachtungen wird angenommen, dass das für eine Detektion der Partikel nötige SNR einen Wert von ≥ 10 besitzt (Abb. 4-1). Sämtliche gepulste Laser liegen unter diesem Wert, während der CW-Laser bei einer experimentellen Taktung von 100 Hz und einer Leistung von 5 W erstmals darüber liegt. Kontinuierliche Laser, die bei 10 Hz Experimen-

ten eingesetzt würden, lägen unabhängig von der Leistung über dem notwendigen Signal-Rausch-Verhältnis.

4.2 Evaluierung unterschiedlicher Messsysteme

Neben der theoretischen Abschätzung (siehe Abschnitt 4.1) wurden unterschiedliche optische Systeme experimentell miteinander verglichen. Vor der Untersuchung der Systeme lag allerdings die Identifikation von geeignetem Probenmaterial, welches sich an den später durchzuführenden Sortierexperimenten orientieren sollte. Unter der Annahme, dass die Zellsortierung zunächst auf Lymphozyten ausgerichtet werden sollte, die einen Durchmesser von ca. 10 μm besitzen, boten sich für die Untersuchungen gleich große Rhodamin B Beads an.

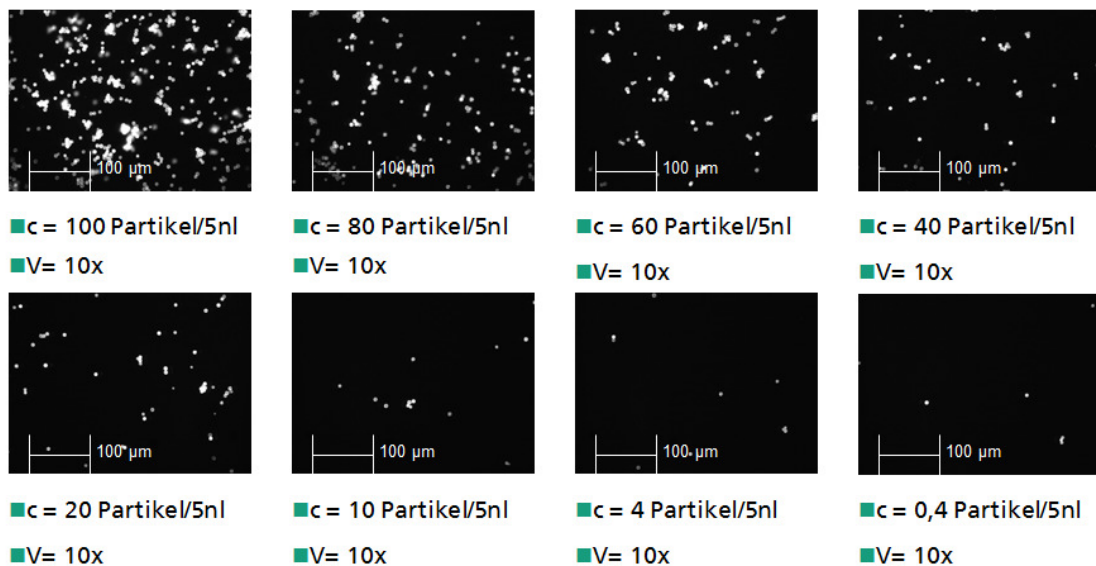


Abbildung 4-2: Mikroskopische Aufnahmen einer Verdünnungsreihe mit Rhodamin B-Partikeln. Es zeigte sich, dass sich ab einer Konzentration von ca. 20 Partikeln/5nl nur noch wenige Partikel ansammelten.

Der Farbstoff weist bei einer Wellenlänge von 542 nm eine optimale Anregung auf, während sein Emissionsmaximum bei 565 nm liegt. Weiterhin wurde zur Bestimmung der geeigneten Partikel-Konzentration eine Verdünnungsreihe

hergestellt, wobei als Lösungsmittel destilliertes Wasser verwendet wurde. Ein invertiertes Mikroskop mit einem gekoppelten gepulsten Nd:Yag-Laser und einer Emissionswellenlänge von 532 nm diente der Untersuchung der Verdünnungsreihe. Die Auswertung ergab, dass eine Konzentration von ca. ≤ 20 Partikeln/5nl geeignet war, um eine möglichst große Anzahl einzelner Beads vorliegen zu haben (Abb. 4.2). Die Erkenntnis war relevant, da in den folgenden Versuchen die optischen Systeme dazu genutzt werden sollten, einzelne Partikel zu erkennen. Häufig auftretende Partikelansammlungen besitzen insgesamt eine höhere Intensität als einzelne Partikel und waren deshalb für die Untersuchung nur unzureichend geeignet.

Um die Versuchsbedingung noch realistischer zu gestalten und zu überprüfen, ob sich fluoreszierende Partikel auch innerhalb von Mikrofluidiken detektieren lassen, wurde eine nicht kontaktierte Mikrofluidik mit der optimalen Konzentration an Rhodamin B Beads befüllt und mit dem invertierten Mikroskop erfolgreich untersucht. Nach Abschluss der Untersuchungen wurde die gleiche Mikrofluidik auch für sämtliche folgende Versuche verwendet. Als weitere Probenmaterialien wurden Phycoerythrin (PE) markierte Beads und Zellen für die Systemevaluierung verwendet. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt bei 565 nm, während die Wellenlänge des Emissionsmaximums 573 nm beträgt.

Innerhalb des Vergleichs unterschiedlicher Messstände kam zunächst ein Aufbau zum Einsatz, bei dem die Probe von einem gepulsten Laser angeregt und die Fluoreszenz durch eine freistehende Kamera detektiert wurde (ILA-GmbH) (Abb.4-3 a). Zusätzlich befand sich vor der Kameralinse ein Bandpassfilter, der lediglich das Fluoreszenzlicht des Rhodamin B passieren ließ. Des Weiteren wurde ein ähnliches System verwendet, lediglich kam anstatt des gepulsten Lasers ein Laser mit einer kontinuierlichen Lichtemission (CW-Laser) zum Einsatz (LaVision GmbH) (Abb.4-3 b). Bei den genannten Festkörperlaser handelt es sich um frequenzverdoppelte Nd:Yag-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser), die bei einer Wellenlänge von 532 nm emittierten.

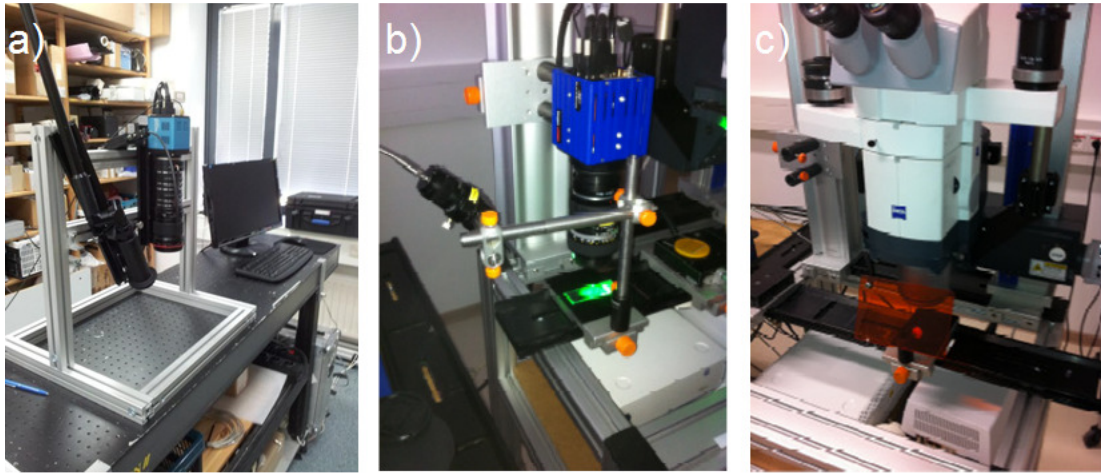


Abbildung 4-3: Messstände mit frequenzverdoppeltem Nd:Yag-Laser als Lichtquelle. a) Freistehender Aufbau mit gepulstem Laser. b) Freistehender Aufbau mit kontinuierlicher Lasereinstrahlung. c) Stereomikroskop mit integriertem CW-Laser

Als drittes System wurde ein Stereomikroskop (LaVision GmbH) untersucht, das die Proben ebenfalls durch den kontinuierlichen frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser anregte (Abb.4-3 c).

Da der entwickelte Mikrochip eine Fläche von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ aufweist, ist die Möglichkeit zur Bestrahlung des gesamten Chips eine notwendige Voraussetzung für die Eignung des optischen Systems. Vor diesem Hintergrund muss ein Laserstrahl oder der Strahl einer äquivalenten Lichtquelle auf die entsprechende Fläche aufgeweitet werden. Auf Grund dieser Modifikation entsteht ein beträchtlicher Intensitätsverlust hinsichtlich der auftreffenden Strahlung, welcher wiederum eine Abschwächung der Fluoreszenz nach sich zieht. Die Leistung sämtlicher Laser betrug deshalb 10 W und ist im Vergleich zu den in der Durchflussszytometrie verwendeten Lasern als hoch einzuschätzen. Sämtliche verwendete Kameras besaßen einen Fünf-Megapixel Kamerachip mit einer Quanteneffizienz zwischen 53% und 57%.

Neben den Laser-basierten Messsystemen kam ebenfalls ein Mikroskop (Axio Zoom V.16, Zeiss AG) mit einer Halogendampflampe als Anregungsquelle in Betracht (Abb. 4.4).

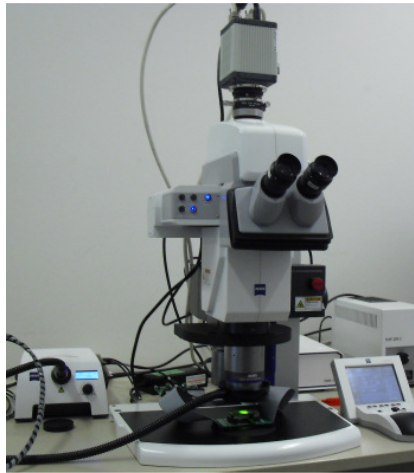


Abbildung 4-4: Fluoreszenz-Zoom-Mikroskop mit einer Kamera und einer Quecksilberdampflampe als Anregungsquelle

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Geräten besitzen Halogendampflampen kein monochromatisches Licht, sondern Weißlicht, das sich über den gesamten sichtbaren Bereich erstreckt. Die spezifischen Anregungswellenlängen für die verwendeten Fluorophore werden über einen Bandpassfilter aus dem Spektrum isoliert. Ein dichroitischer Spiegel sorgt für die Einkopplung des anregenden Lichtes in den Strahlengang des Objektives, ohne den Durchtritt der Fluoreszenzemission zu behindern. Das rückfallende fluoreszierende Licht wird ebenfalls am Strahlteiler in die Richtung einer CCD-Kamera gelenkt. Letzte Bestandteile des Anregungslichtes, die ebenfalls am Detektor ankommen, werden durch einen zusätzlichen Emissionsfilter eliminiert. Das Mikroskop lässt sich gleichzeitig mit bis zu vier Filtersätzen bestücken.

Es zeigte sich, dass mit allen drei getesteten Lasersystemen einzelne Beads innerhalb der Mikrofluidik erkannt werden konnten (Abb. 4-5 a, c, e). Zusätzlich waren die Strukturen der Mikrofluidik im Hintergrund zu sehen. Eine Situation, in der Licht von der Oberfläche der Mikrofluidik reflektiert wird und die Fluoreszenz der Beads überdeckt, trat nicht auf.

Weitaus schwieriger als Rhodamin B-Beads lassen sich gefärbte Zellen detektieren, da sie eine geringere Anzahl an Fluorophoren tragen. Anhand von Phycoerythrin-markierten T-Lymphozyten ließ sich bestimmen, ob die optischen Systeme ebenfalls zur Erkennung biologischer Zellen auf einer Fläche von 20×20

μm^2 geeignet sind. Es zeigte sich, dass sich vor allem mit dem gepulsten Lasersystem keine Zellen nachweisen ließen (Abb. 4-5 b), während auf den Bildern, welche mit einem CW-Laser erzeugt wurden, deutliche Fluoreszenzsignale zu erkennen waren (Abb. 4-5 d, f). Lediglich in der Häufigkeit, mit der die Signale auftraten, unterschieden sich die Ergebnisse. So zeigte die Probe, die mit dem freistehenden Aufbau untersucht wurde (Abb. 4-5 d), gegenüber dem Untersuchungsobjekt, welches mit dem Mikroskop betrachtet wurde (Abb. 4-5 f), eine höhere Anzahl an Zellen. Diese Differenz könnte darin begründet sein, dass auf den beiden Proben die Anzahl der Zellen tatsächlich verschieden groß ist oder in einer geringeren Leistungsfähigkeit des mikroskopischen Aufbaus. Beispielsweise lässt sich vermuten, dass durch die zusätzlichen optischen Elemente die Transmission des Fluoreszenzlichtes zum Kamerachip reduziert wird.

Zur Erklärung für die schlechtere Leistung des gepulsten Lasers gegenüber dem CW-Laser bezüglich der Zellerkennung lässt sich die Gleichung 4.1 zur Abschätzung der Photoelektronenausbeute heranziehen.

Außerdem ist die Bestrahlungsdauer durch die Pulse vergleichsweise kurz. Der CW-Laser emittiert eine energieärmere Strahlung, die nicht der Sättigung unterliegt und die kontinuierlich abgegeben wird, sodass die Bestrahlungsdauer wesentlich länger ist. Der letztlich geringere Strom an Photoelektronen reicht im Fall der gepulsten Laser offensichtlich nicht aus, um ein Signal zu erzeugen, das über das Signal-Rausch-Verhältnis der Kamera hinaus geht und schließlich sichtbar wird.

Auf sämtlichen Bildern fällt auf, dass es Schwierigkeiten hinsichtlich der Bestimmung der Anzahl der Zellen gibt, wenn sich diese lokal akkumulieren. Zu sehen ist in diesem Fall eine mehrere Partikel große Fläche, in der die Umrisse einzelner Partikel nicht zu erkennen sind. Die Anzahl der Partikel in einem Flüssigkeitstropfen ist für eine Zellsortierung allerdings von entscheidender Bedeutung, da von ihr die Anzahl der notwendigen Teilungsschritte abhängt. Um die Partikelansammlungen untersuchen zu können, wäre eine Zoomfunktion eines Mikroskops von großem Nutzen.

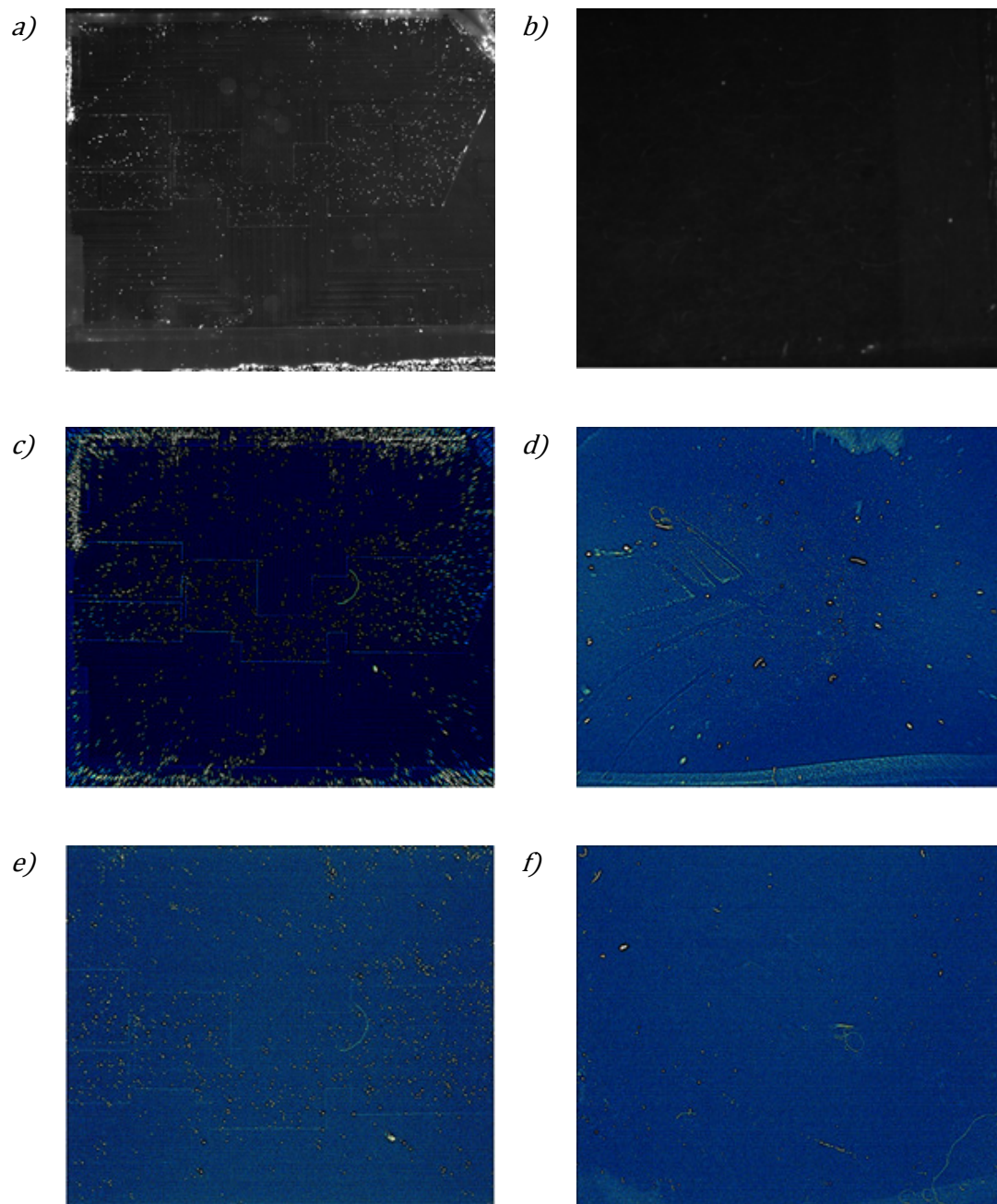


Abbildung 4-5: Detektion von Rhodamin B-Partikeln in einer Mikrofluidik und Messungen an Phycorythrin gefärbten biologischen Zellen mit Hilfe eines freistehenden Aufbaus und einem gepulsten Laser (a, b), einem freistehenden Aufbau und einem CW-Laser (c, d) und einem Mikroskop mit einem gekoppelten CW-Laser (e, f).

Aus dem genannten Grund wurde zusätzlich ein Fluoreszenzmikroskop auf seine Eignung hin überprüft.

Untersucht wurden wiederum Phycoerythrin markierte Zellen innerhalb von Bildausschnitten der Größe $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ und $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$.

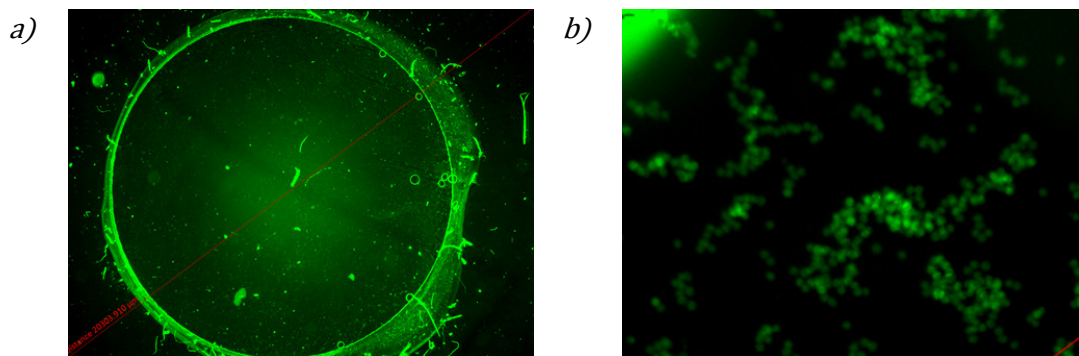


Abbildung 4-6: Aufnahme PE markierter Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop auf Bildfeldern von a) $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ und b) $1,2 \times 1,2 \mu\text{m}^2$.

Auf der Aufnahme mit einem großen Sichtfeld lassen sich fluoreszierende Objekte erkennen, ohne die genauen Konturen einzelner Zellen bestimmen zu können (Abb. 4-6 a). Durch eine Verwendung der Zoomfunktion ergibt sich ein detailreicheres Bild, in dem einzelne Zellen aufgelöst werden (Abb. 4-6 b).

Die Entscheidung, welches der untersuchten Systeme für den Messstand zur Beobachtung der Mikrofluidik und zur Sortierung der Zellen optimal ist, wurde auf der Grundlage der vorliegenden Untersuchungen gefällt. Zunächst ließ sich festhalten, dass die Rhodamin B-Partikel mit allen Aufbauten auf einer zur Größe des Mikrochips vergleichbaren Bildfläche erkennbar waren. Anders gestaltete sich die Situation bei der Untersuchung Phycoerythrin markierter biologischer Zellen. In diesem Fall wurden die Zellen nur durch die mit einem CW-Laser ausgestatteten Geräte und mit Hilfe des an eine Halogendampflampe gekoppelten Fluoreszenzmikroskops erkannt. Im Allgemeinen bieten Systeme mit einer kontinuierlichen Lichteinstrahlung den Vorteil einer länger andauernden Anregung der Fluorophore, sodass die Fluoreszenzstrahlung ausreicht, um ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis zu erzeugen. Im Gegensatz dazu rei-

chen die kurzen Pulse des getakteten Lasers nicht aus, um genügend Photonen zu erzeugen.

Weiterhin besitzen CW-Laser grundsätzlich eine höhere Bestrahlungsstärke als Halogendampflampen. Während einer Zellsortierung müssten die Zellen demnach im Vergleich zu einer Halogendampflampe nur eine kürzere Zeit einem Laserstrahl ausgesetzt sein, um eine nachweisbare Menge an Photonen zu erzeugen. Somit wäre ebenfalls eine höhere Geschwindigkeit der Zellsortierung durch den Einsatz lasergestützter Systeme zu erreichen. Ein weiterer Unterschied der beiden Systeme ist das Lichtspektrum und die damit verbundene Nutzbarkeit unterschiedlicher Farbstoffe. Die Halogendampflampe bietet ein polychromatisches Spektrum, welches sich über den gesamten sichtbaren Bereich erstreckt, während ein Laser fokussiertes monochromatisches Licht erzeugt. Aus dem spektral breiten Licht kann durch die Verwendung von Bandpassfiltern ein frei wählbarer schmaler Wellenlängenbereich herausgeschnitten und auf die Probe projiziert werden, sodass bezüglich der Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe eine große Flexibilität gegeben ist. Das monochromatische Licht besitzt hingegen nur einen festgelegten Wellenlängenbereich und ist daher auch nur mit weniger Farbstoffen kombinierbar. Noch deutlicher wird der Unterschied durch die Einbeziehung der Tatsache, dass letztlich zwei unterschiedliche Zellspezies voneinander getrennt werden sollen. Ein hypothetisches Anregungsschema für diese Aufgabe, unter Verwendung einer Halogendampflampe, könnte zwei unterschiedliche Anregungswellenlängen enthalten, die deutlich spektral getrennte Fluoreszenzemissionen erzeugen. Im Fluoreszenzmikroskop wird dies realisiert, indem nacheinander zwei Kamerabilder mit unterschiedlichen Filtermodulen aufgenommen werden (Abb. 4-7 a). Bei einem Lasersystem müssten die Farbstoffe so gewählt werden, dass die monochromatische Anregungswellenlänge gleichzeitig zwei spektral getrennte Fluoreszenzemissionen hervorruft, die beispielweise gleichzeitig durch zwei Kameras mit unterschiedlichen Emissionsfiltern detektiert werden könnten (Abb. 4-7 b). Diese Anforderung an die Fluorophore schränkt die Auswahl der Farbstoffe stark ein.

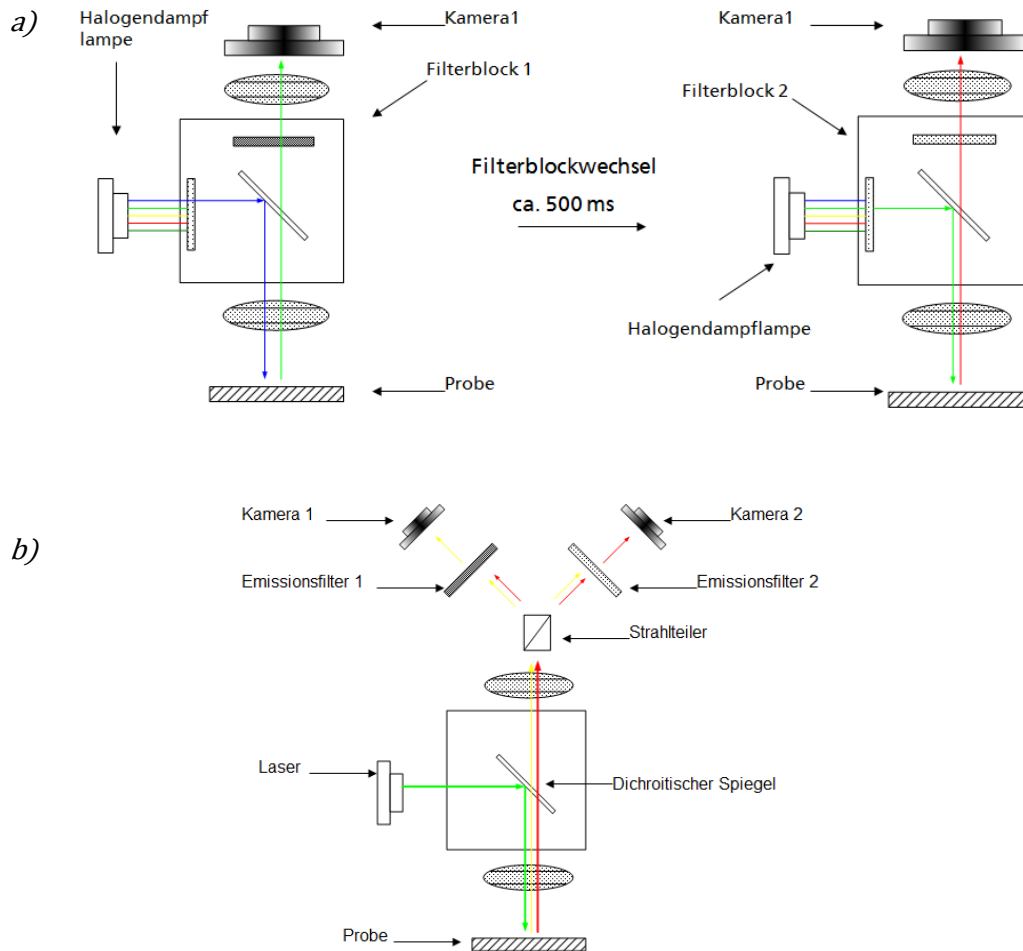


Abbildung 4-7: a) Anregungsschema eines Fluoreszenzexperimentes mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren, wobei ein Fluoreszenzmikroskop zur Detektion eingesetzt wird. b) Verfahren für den Nachweis zweier Fluorophore mit Hilfe eines Lasersystems.

Es ist allerdings zu erwähnen, dass durch die Vermeidung eines Filterblockwechsels weitere Zeit während der Detektion der Fluoreszenz gespart werden kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Lasersystem das Potential für eine schnellere Zellsortierung besitzt, da es die höhere Bestrahlungsstärke aufweist und die Vermeidung eines Filterblockwechsels zu einer geringeren Dauer der Fluoreszenzdetektion führt. Hingegen bietet ein Fluoreszenzmikroskop eine höhere Flexibilität bezüglich der Auswahl der Fluorophore und einen optischen Zoom zur Beurteilung von Zellansammlungen. Letztlich wurde für

den Aufbau des Messstandes zur Untersuchung mikrofluidischer Systeme das Fluoreszenzmikroskop benutzt, da in Absprache mit potentiellen Anwendern beispielsweise eine Anregung der Fluorophore im UV-Bereich und bei einer zusätzlichen Wellenlänge interessant wäre.

5 Charakterisierung des Funktionsmusters 1

Das Funktionsmuster 1 umfasst einen ansteuerbaren mikrofluidischen Chip (Bartels Mikrotechnik GmbH), der auf einem Glassubstrat basiert und durch ein LabVIEW-Programm angesteuert werden kann. Die Elektroden sowie die Zuleitungen bestanden aus ITO. Das Oxid wurde zunächst ganzflächig auf das Glas aufgebracht und nachträglich mit einem Laser strukturiert. Siliziumnitrid wurde als dielektrische Schicht benutzt, und zur Hydrophobisierung kam Teflon zum Einsatz, das in einem Tauchverfahren abgeschieden wurde. Die Deckelektrode, die ebenfalls aus einem ITO-beschichteten Glassubstrat bestand, wurde durch einen Spacer aus PET-Folie von dem Elektrodenarray auf der Bodenplatte getrennt [58]. Im Wesentlichen diente das Funktionsmuster 1 der Demonstration der Fluidoperationen anhand von Flüssigkeitstropfen, die fluoreszierende Partikel beinhalteten. Weiterhin ließ sich feststellen, ob sich das letztlich verwendete Fluoreszenzmikroskop zur Beobachtung des Zellsortie-

rungsprozesses eignete. Für die Versuche wurden zwei unterschiedliche Bead-spezies benutzt. Um den Farbstoff DAPI zu detektieren, kam ein Filter mit einer Anregungswellenlänge von 300–400 nm und einer Emissionswellenlänge von 410–460 nm zum Einsatz, und ein Filterset mit Transmissionen bei 450–495 nm und 500–550 nm wurde zur Aufnahme der GFP-markierten Partikel benutzt. Zum qualitativen Nachweis der Teilungsoperation wurde vor und nach der Tropfenteilung ein Kamerabild aufgenommen, auf dem die einzelnen Beads manuell ausgezählt wurden.

5.1 Nachweis relevanter Fluidoperationen

Das Funktionsmuster 1 wurde mit Hilfe der beschriebenen Materialien untersucht. Der experimentelle Aufbau, bestehend aus einem Mikroskop und einer ansteuerbaren Mikrofluidik (Bartels Mikrotechnik GmbH), ist in Abb. 5-1 dargestellt.

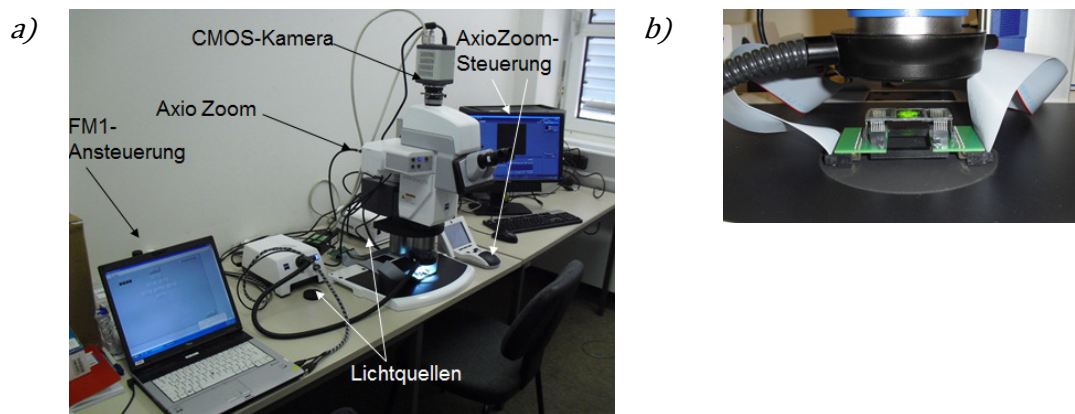


Abbildung 5-1: Experimenteller Aufbau zur Untersuchung des Funktionsmuster 1 b) Mikrofluidischer Chip aus Glas unter einem 0,5 x Objektiv des Fluoreszenzmikroskops.

Mit den Experimenten sollten die Grundoperationen der Zellsortierung anhand von Wassertropfen mit unterschiedlich fluoreszierenden Partikeln gezeigt werden. In der Mitte der Abbildung 5-2 befand sich ein Elektrodenarray, wobei aufgrund des Fluoreszenzfilters innerhalb des Strahlenganges des Mikroskops die

einzelnen Elektroden nicht zu erkennen waren. An die Elektrodenmatrix waren 4 Reservoirs angeschlossen, die größere fingerförmige Elektroden enthielten. Mit Hilfe des Aufbaus konnten alle relevanten Fluidoperationen nachgewiesen werden. In der Bildfolge wurde zunächst ein Tropfen generiert und durch Schalten der Elektroden in die Mitte der Anordnung transportiert. Dort fand eine Teilung des Tropfens statt. Auf den Bildern ist lediglich eine Beadspezies zu erkennen, da sie einer Videosequenz entstammen, bei der eine zweikanalige Aufnahme nicht möglich war.

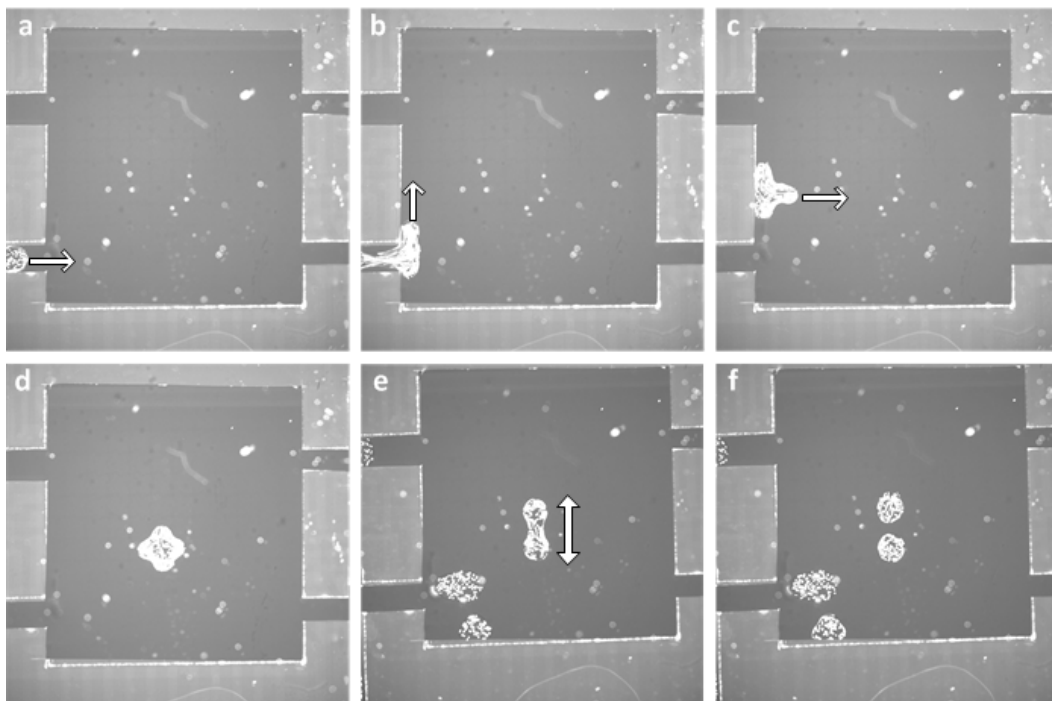


Abbildung 5-2: Die Bildsequenz zeigt die Fluidoperationen Generieren, Transportieren und Teilen anhand eines partikelhaltigen Flüssigkeitstropfens.

Nach einer Tropfenteilung wird bei einer Zellsortierung die Anzahl der Beads bestimmt, die sich in den entstandenen Tropfen befinden. Auf dieser Grundlage soll durch einen Sortieralgorithmus entschieden werden, ob der Tropfen erneut geteilt werden muss oder ob nur noch eine Spezies vorhanden ist und der Tropfen aus dem System befördert werden kann.

Mit Hilfe des beschriebenen Aufbaus wurde dieser als automatisiert geplante Vorgang in manueller Weise durchgeführt.

Insgesamt ließen sich beide Partikelsorten durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfilter voneinander unterscheiden, wobei die GFP-Beads auf den Bildern einen größeren Durchmesser und weniger scharfe Konturen besaßen als die DAPI-Partikel (Abb. 5-2). Der Größenunterschied war in diesem Fall real vorhanden und nicht der Darstellung geschuldet, während die Ursache der verzerrten Kontur in einer nicht fokussierten Aufnahme der GFP-Beads lag.

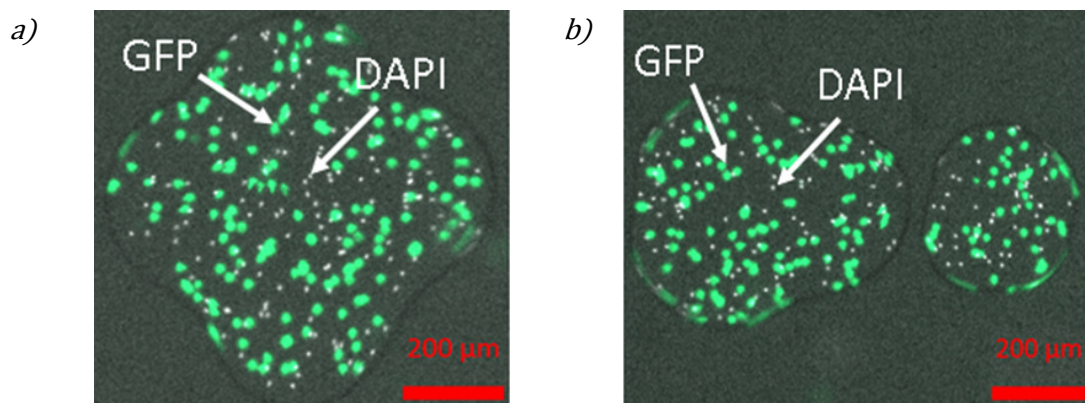


Abbildung 5-3: Partikelhaltige Flüssigkeitstropfen a) vor und b) nach der Teilung.

Zusätzlich wurde bei der Betrachtung der Tropfen während des Zustandes eingeschalteter Elektroden eine Zirkulation der Beads beobachtet, die durch die Inaktivierung der Elektroden endete. Aufgrund der verzerrten Darstellung der Partikel an den Rändern des Tropfens lässt sich schließen, dass in diesem Bereich ihre Geschwindigkeit maximal ist.

Untersuchungen zeigen, dass die Bewegung der Partikel durch Flüssigkeitsströme innerhalb der Tropfen erzeugt wird. Diese Flüssigkeitsbewegungen resultieren aus einem ständigen periodischen Wechsel des Kontaktwinkels, der durch das elektrische Wechselfeld hervorgerufen wird [62]. Während des Experimentes lag ein modulierte Rechtecksignal mit einer Frequenz von 1 kHz und einer Amplitude von 35 V an. Die Belichtungszeit der Kamera betrug 190 ms.

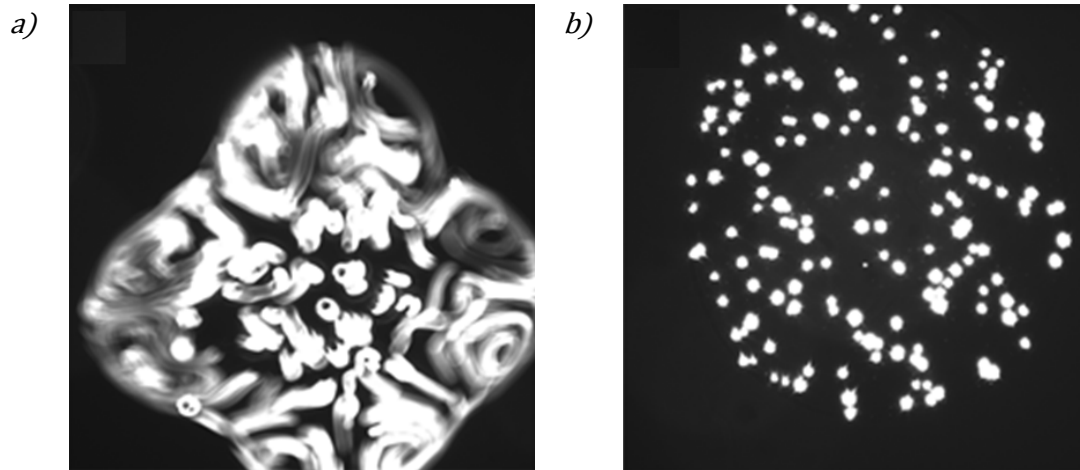


Abbildung 5-4: a) Zirkulierende Beads bei eingeschalteter Spannung. b) Bewegungslose Partikel bei inaktivierten Elektroden.

Zusätzlich ließ sich feststellen, dass die Materialien der Mikrofluidik während des Betriebs einem Verschleißprozess unterzogen waren und die Qualität und die Präzision, mit der die Fluidoperationen ausgeführt wurden, abnahm. Insbesondere die Beschädigung der dielektrischen Schicht und der damit verbundene direkte Kontakt der Flüssigkeit mit der Elektrode verursacht Hydrolyse, durch die sich eine Oxidschicht auf den Elektroden aufbaut. Überschreitet die Schicht eine bestimmte Dicke, ist ihre Isolationswirkung so stark, dass das elektrische Feld nicht mehr in die Nähe des Tropfen gelangt und keine Tropfenbewegung mehr ausgeführt werden kann [63].

6 Prozessentwicklung und Aufbau des Zellsortier-Chips

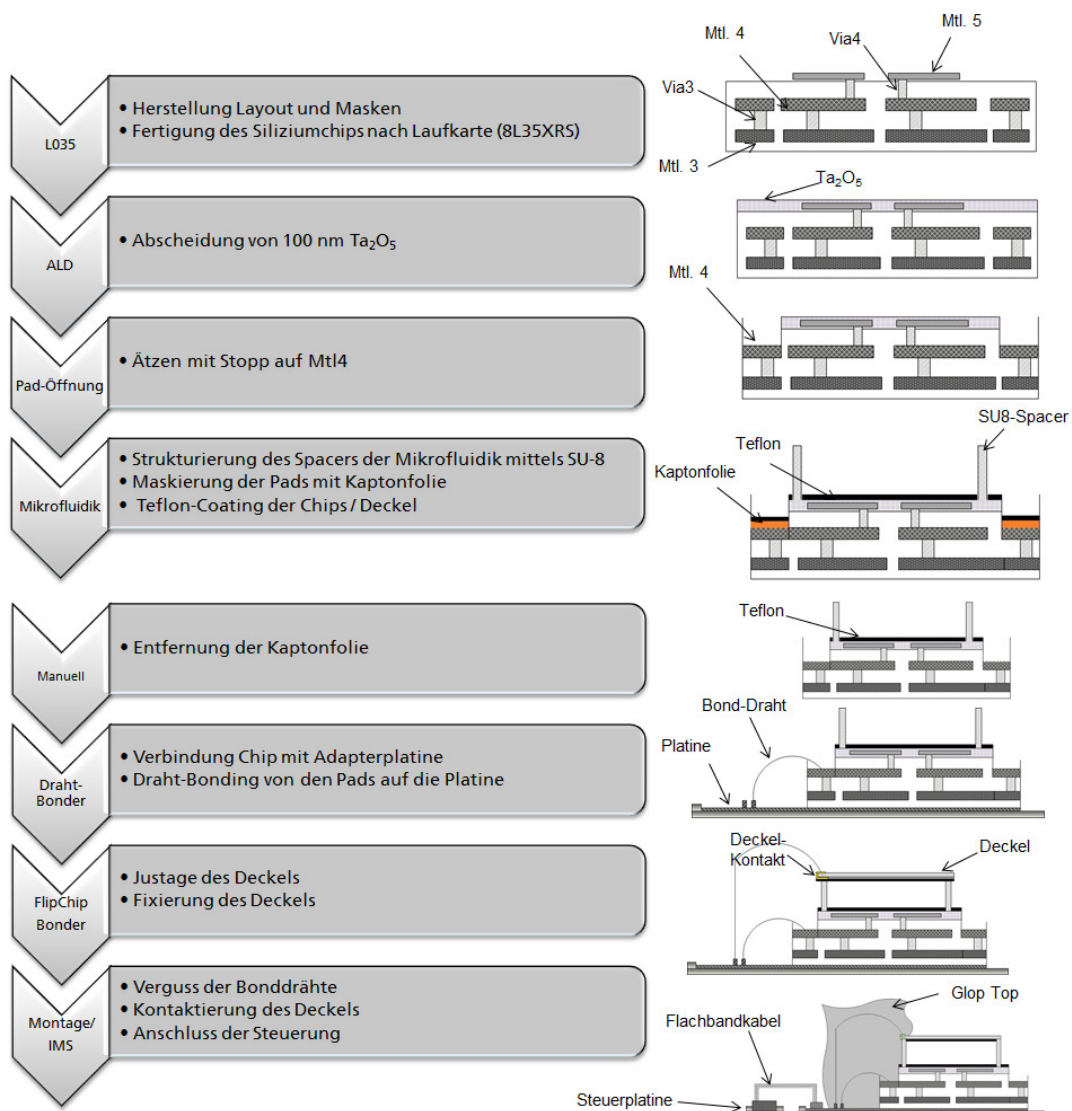


Abbildung 6-1: Flussdiagramm des Herstellungsprozesses des EWOD-Chips inklusive Ansteuerung

Die Herstellung des EWOD-Chips umfasst unter anderem die Herstellung des Layouts, die damit verbundene Auswahl der benötigten Masken sowie die Chipfertigung mit Hilfe eines CMOS-Prozesses. Des Weiteren wird auf das Verfahren zur Abscheidung einer dielektrischen Schicht (Atomic Layer Deposition) eingegangen. Experimente mit Photolacken zur Aufbringung eines Spacers werden vorgestellt. Ferner werden die Justierung der Deckelektrode und die Kontaktierung des Chips beschrieben. Zuletzt wird die Planung der Charakterisierungsexperimente erläutert.

Abbildung 6-1 zeigt den gesamten Herstellungsprozess in einem Flussdiagramm.

6.1 Herstellung des Layouts und des Siliziumchips

Der Siliziumchip wurde nach einem standardisierten CMOS-Prozess (L035) in den Reinräumen des Fraunhofer IMS gefertigt. Ein Chip-Layout wurde zuvor mit einer Software zur Herstellung von integrierten Schaltkreisen (Cadence, Virtuoso) erzeugt, um es schließlich als Grundlage für die benötigten Masken zu nutzen. Der L035 CMOS-Prozess beinhaltet im Wesentlichen vier Metalllagen, die jeweils über Vias miteinander verbunden sind. Weiterhin gibt es durch eine spezielle Option die Möglichkeit, noch eine weitere Metalllage hinzu zu fügen. In dem erstellten Layout kamen lediglich die drei oberen Metalllagen zum Einsatz, sodass auch nur diese Schichten im Layout auftauchen. Bei der Erstellung des Layouts mussten spezielle Design-Regel beachtet werden, die durch den angewendeten CMOS-Prozess vorgegeben waren. So durften die Flächen in der Ebene Mtl. 3 eine Breite von $0,64\text{ }\mu\text{m}$ nicht unterschreiten, während ihre Abstände zueinander eine größere Distanz als $0,6\text{ }\mu\text{m}$ zueinander aufweisen mussten. Für die minimale Breite der Ebene Mtl. 4 galt ein Wert von $1,44\text{ }\mu\text{m}$ und ein minimaler Abstand von $1,4\text{ }\mu\text{m}$. Beide Ebenen wurden aus Aluminium gefertigt, wobei die Schicht Mtl. 3 $0,6\text{ }\mu\text{m}$ und die Schicht Mtl. 4 $0,8\text{ }\mu\text{m}$ dick ist. Bezüglich der Ebene Mtl. 5 wurde eine Breite von $1,0\text{ }\mu\text{m}$ und ein Abstand von $0,4\text{ }\mu\text{m}$ als untere Grenze angegeben. Die Lage besteht aus Titan/Titannitrid und besitzt eine Dicke von $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Sämtliche Metalle wurden zunächst durch eine physikalische Gasphasenabscheidung aufgetragen. Daraufhin erfolgten das Aufbringen und

die Strukturierung eines Photolacks und schließlich ein plasmabasiertes Ätzen des Metalls.

Die Metallebenen Mtl. 3 und Mtl. 4 werden durch die Vias 3 miteinander verbunden, wobei diese eine exakte Breite von $1,44\text{ }\mu\text{m}$ und eine minimale Länge von $1,44\text{ }\mu\text{m}$ besitzen müssen. Der Abstand zwischen den Vias hat die Strecke $1,56\text{ }\mu\text{m}$ zu überschreiten. Zwischen Mtl. 4 und Mtl. 5 liegen die Vias 4, für dessen Breite ein Wert von $1\text{ }\mu\text{m}$ und dessen Länge ein Betrag von $\geq 1,44\text{ }\mu\text{m}$ angegeben ist. Um die Vias herzustellen, wurde auf der jeweiligen Metallschicht ein Oxid abgeschieden und mit einem strukturierten Lack versehen. Anschließend kam ein plasmabasiertes Ätzverfahren zum Einsatz, um Löcher in das Oxid zu ätzen, die bis zu der darunterliegenden Metallschicht reichten. Durch die direkt folgende Abscheidung der nächsten Metallebene wurden somit zwei Metallschichten an der Stelle der Löcher miteinander kontaktiert. Zwei weitere Masken waren nötig, um zum einen die Metall-Pads freizulegen und zum anderen den SU-8 Spacer zu strukturieren.

Das Layout des Siliziumchips (Abb. 6-2 a) beinhaltetete sämtliche Vorgaben, die durch den standardisierten CMOS-Prozess L035 vorgegeben waren. Auf dem Layout wurden sämtliche Elektroden in Ebene Mtl. 5 eingezeichnet (Blau). Zu sehen sind die bereits beschriebenen Transport-, Reservoir- und Generierelektroden. Weiterhin umgeben die Kontaktpads in einer quadratischen Anordnung das Elektrodenarray, wobei sie bei dieser Auflösung aufgrund ihres Abstandes von $20\text{ }\mu\text{m}$ nicht einzeln zu erkennen sind. Abgebildet ist ebenfalls die Spacer-Maske (Braun), die die Elektrodenmatrix umgibt und zusätzlich die Reservoirformt. Die Leiterbahnen in der untersten Schicht befinden sich in der Ebene Mtl. 3 (Pink), während die Leitungen in der darüber liegenden Schicht als Mtl. 4 bezeichnet werden (Gelb). Ebenfalls sind zwei Lithographie-Marken vorhanden, die zur Justierung der Masken während der lithographischen Strukturierung des Spacers und der Kontaktpads benötigt werden. Zur Überprüfung, ob eine elektrisch leitende Verbindung zwischen den Leiterbahnen und den Elektroden besteht, wurde eine zusätzliche Teststruktur auf dem Chip vorgesehen. Sie besteht aus einer Elektrode, die an ein Kontaktpad angeschlossen ist und die den übrigen angeschlossenen Elektroden und Kontaktpads gleicht. Die Umsetzung des Chiplayouts in einen Siliziumchip erfolgte in den Reinräumen des Fraun-

hofer IMS unter Verwendung der genannten Technologie. Nach der Herstellung des Wafers und der Vereinzelung der Chips durch einen Sägevorgang wurde die Oberfläche des Chips unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Ergebnis begutachtet, dass sämtliche Strukturen, die auf dem Chiplayout vorgesehen waren, auch unter dem Mikroskop wiedererkannt werden konnten (Abb. 6-2 b).

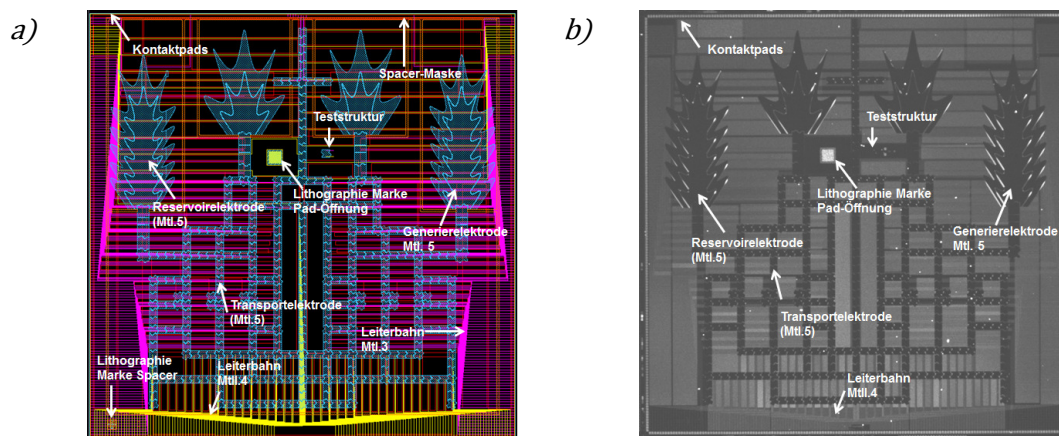


Abbildung 6-2: a) Chiplayout und b) mikroskopische Aufnahme des gefertigten Siliziumchips.

Durch eine Analyse mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) war es möglich eine Querschnittsaufnahme des Chips zu erzeugen, welche die Leiterbahnen und die Kontaktpads sichtbar machte. Auf der Abbildung 6-3 sind die Vias eines Kontaktpads sowie die Leiterbahnen der Ebene Mtl. 3 und Mtl. 4 zu erkennen. Sie weisen die in den Designregeln vorgegebenen Dicken von $0,6\ \mu\text{m}$ bzw. $0,8\ \mu\text{m}$ auf.

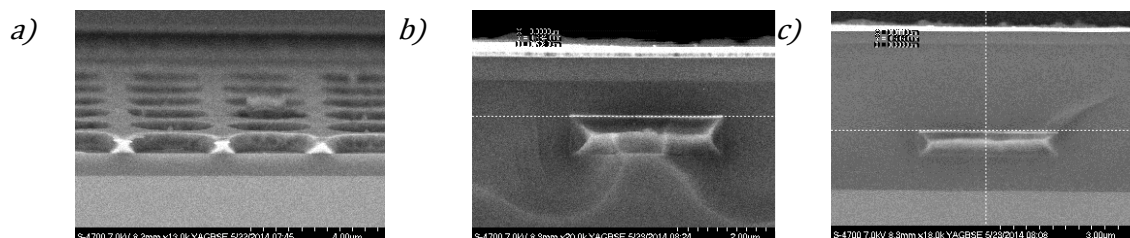


Abbildung 6-3: REM-Aufnahmen der a) Vias auf den Kontaktpads sowie der Leiterbahnen der Metallebenen b) Mtl. 3 und c) Mtl. 4

6.2 Abscheidung des Dielektrikums

Auf die oberste Metallebene wurde eine 100 nm dicke Tantalpentoxid-Schicht (Ta_2O_5) mittels Atomlagenabscheidung (Atomic Layer Deposition, ALD) aufgebracht. Um die gesamte Schichtdicke zu erreichen, wurden insgesamt 1285 Abscheidungszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus begann mit einer selbst begrenzenden Reaktion des Reaktanden Tantaloxids (TaEtO). Der Precursor wurde zunächst auf eine Temperatur von 185 °C aufgeheizt, um dann in der Reaktionskammer bei einer Temperatur von 270 °C mit der Oberfläche des Substrates zu reagieren. Die Pulsdauer betrug 1,6 s. Danach erfolgte unter Verwendung von Stickstoff ein 8 s andauernder Spülschritt, um nicht reagiertes Gas des Reaktanten zu entfernen. Als zweiter Reaktand wurde 26 °C warmes Wasser (H_2O) eingeleitet, wodurch eine selbstbegrenzende Reaktion mit dem ersten Reaktanten ablief. Die Abscheidetemperatur betrug wiederum 270 °C bei einer Pulsdauer von 0,1 s. Die Entfernung des überschüssigen Gases erfolgte durch eine Wiederholung des zuvor beschriebenen Spülschrittes.

Die Beurteilung der Schichtdicke des Oxids erfolgte anhand einer REM-Untersuchung (Abb. 6-4). Auf dem Bild ist das Dielektrikum als oberste helle Schicht zu erkennen, während die darunter liegende dunklere Schicht aus unterschiedlichen Oxiden besteht. Für den Aufbau wurde Ta_2O_5 benutzt, da das Material ein so genanntes „High-k-Dielektrikum“ ist und eine Permittivität von 24 bis 28 aufweisen kann. Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sich beispielsweise bei Kondensatoren die Schichtdicken des Dielektrikums vergrößern, ohne die Kapazität zu reduzieren. Dieser Zusammenhang kann anhand der Gleichung 6.1 verdeutlicht werden. Eine erhöhte Dicke der Isolationsschicht d im Nenner führt zu einer geringeren Kapazität. Dies kann durch eine erhöhte Permittivität im Zähler ausgeglichen werden.

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{d} \quad (6.1)$$

Eine solche Vorgehensweise hat dann gleichzeitig den Vorteil, dass Leckströme in einem geringeren Umfang auftreten und im Falle des Electrowettings Elektrolyse verhindert wird. Weiterhin stand als alternatives Material Alumi-

umoxid zur Verfügung, das jedoch aufgrund der niedrigeren Permittivität von 9 bis 10 nicht verwendet wurde.

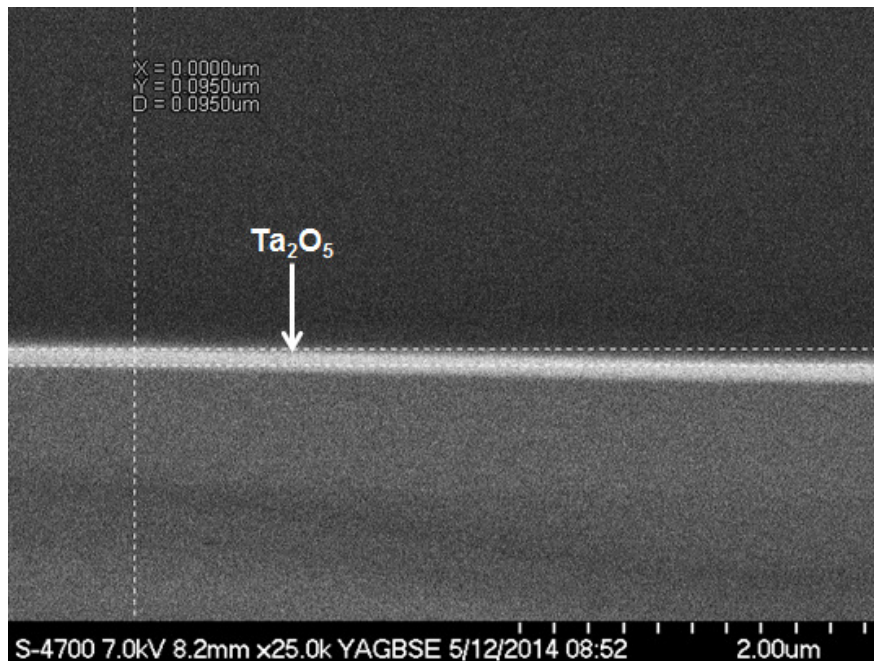


Abbildung 6-4: REM-Aufnahme einer 100 nm dicken Tantalpentoxid-Schicht, die als heller Kontrast auf einem Si-Substrat erkennbar ist.

6.3 Freilegung der Kontaktpads und Kontrolle der Funktionalität

Um den Chip mit einer Leiterplatte kontaktieren zu können, sollten Aluminiumdrähte von dem Chip zur Leiterplatte gezogen werden. Die Befestigung der Drähte auf dem Chip erfolgte auf $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ großen Kontaktstellen, die aus Aluminium bestehen und die quadratisch um den Chip herum angeordnet sind. Dem Herstellungsprozess ist es geschuldet, dass sich über den Kontakt-Pads eine Oxid-Schicht befindet, die zur Freilegung der Pads entfernt werden muss. Zu beachten ist dabei, dass die Entfernung der Oxid-Schicht nur lokal ablaufen darf, um die Funktionalität des Chips nicht zu gefährden. Weiterhin ist es erforderlich, dass der Prozess stoppt, bevor die Aluminiumschicht beschädigt wird. Um die Oxid-Schicht abzutragen, wurde ein plasmaunterstütztes, gaschemi-

sches Trockenätz-Verfahren eingesetzt (Applied Materials P 5000 EtchMxP). Die Begrenzung der Ätz-Reaktion auf den Bereich der Kontaktpads ermöglicht ein lithographisch strukturierter Lack. So wurde, basierend auf einem standardisierten Spincoating-Verfahren (Maximus 804, ATM), auf einem strukturierten Siliziumwafer ein 2,5 µm dicker Positiv-Lack (MEGAPOSIT™ SPR™ 955-CM2.5) aufgetragen, worauf eine Belichtung des Lacks auf einem Stepper (PAS5500, ASML) mit einer Energie von 400 mJ/cm² folgte. Die verwendete Hellfeld-Fotomaske besaß 100×100 µm² große Aussparungen, die über die Kontaktpads des Chips justiert wurden. Die Orientierung des Siliziumwafers zu der Fotomaske konnte durch eine Justiermarke erzielt werden, die im Chip-Layout vorgesehen war. Durch einen Entwicklungsschritt mit einem Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH)-haltigen Entwickler (AZ 826 MIF) wurde der Lack an der Stelle der belichteten Regionen entfernt. In dem folgenden Trockenätzverfahren kamen die Gase CHF₃, CF₄ und Argon zum Einsatz, wobei in der Reaktionskammer ein Druck von 200 mTor herrschte und das Plasma bei 700 W gezündet wurde. Die Expositionszeit des Wafers in der Kammer betrug 450 s, um die gesamte Oxidschicht zu entfernen. Eine Kontrolle des Prozesses wurde durch eine optische Begutachtung der Pads mit Hilfe eines Lichtmikroskops (ECLIPSE L200, Nikon) durchgeführt, welches an eine spezielle Wafer-Ladestation angeschlossen war (NWL 200, Nikon). Ein Sauerstoffplasma ermöglichte schließlich die Entfernung des Fotolacks (Applied Materials P 5000 EtchMxP), und ein weiterer Lösungsmittel basierter Reinigungsschritt sorgte für eine partikelfreie Oberfläche (SST742, SEMITool Austria GmbH).

Auf der Abbildung 6-5 sind die Kontaktpads als quadratische Strukturen zu erkennen, von denen die Leiterbahnen abgehen. Ferner sind weitere kleinere quadratische Metallabscheidungen sichtbar, die als Metallabdeckung bezeichnet werden. Sie besitzen keine Funktionalität hinsichtlich der Zellsortierung, sondern dienen dazu, den Ätzprozess der Metallstrukturen homogener zu gestalten. Ein Vergleich der Aufnahmen zeigt, dass vor dem Ätzen eine Oxidschicht die Pads bedeckte und diese dunkel erscheinen ließ. Nach dem Ätzprozess erschien die hellere Metallschicht, die als Indikator für eine erfolgreiche Öffnung galt. Grundsätzlich wurde die gesamte Ätzdauer durch kürzere alternierende Ätz- und Sichtungsschritte bestimmt. Im Allgemeinen ließe sich aber

auch der Endpunkt des Prozesses mit Hilfe eines optischen Detektors bestimmen, welcher das vom Plasma emittierte Licht analysiert.

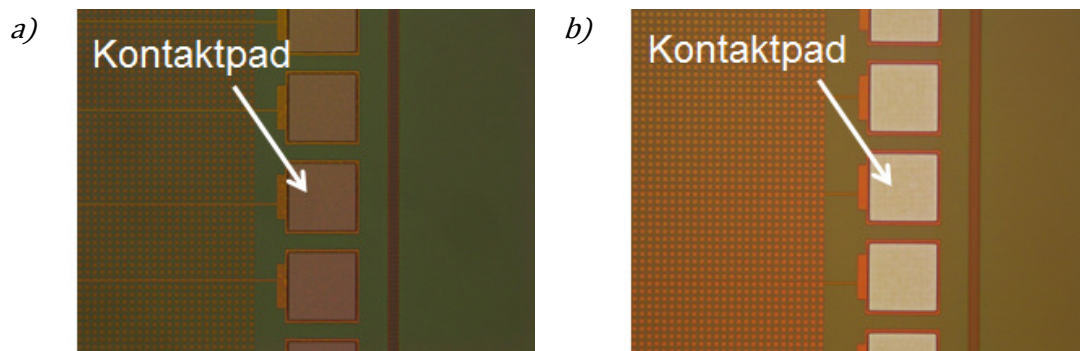


Abbildung 6-5: Kontakt pads a) vor und b) nach dem Ätzen. Vor dem Öffnen der Pads erscheinen diese aufgrund der vorhandenen Oxidschicht dunkel, während nach dem Ätzen das hellere Aluminium zu sehen ist.

Anhand der auf dem Chip vorgesehenen Teststruktur wurde die Funktionalität des aus einem Pad, einer Leiterbahn und einer Elektrode bestehenden Aufbaus überprüft. Dazu wurden mit Nadeln bestückte Mikromanipulatoren (PH120, Karl Süss) an einen Parameter-Analysator (hp4155, Hewlett Packard) angeschlossen, der als Spannungsquelle fungierte. Während der Messung befanden sich die Spitze einer Nadel auf dem Kontaktpad und die andere auf der Elektrode. Die eingepreßte Spannung lag in einem Intervall von 0-1 V, wobei dieses in 20 Schritten mit einer konstanten Erhöhung von 0,05 V durchlaufen wurde. Die Einprägung einer Spannung nach dem genannten Muster ergab die in Abbildung 6-6 dargestellte Strom-Spannungskennlinie. Sie weist einen geraden Verlauf auf und entspricht somit, wie erwartet, einem Ohmschen Widerstand.

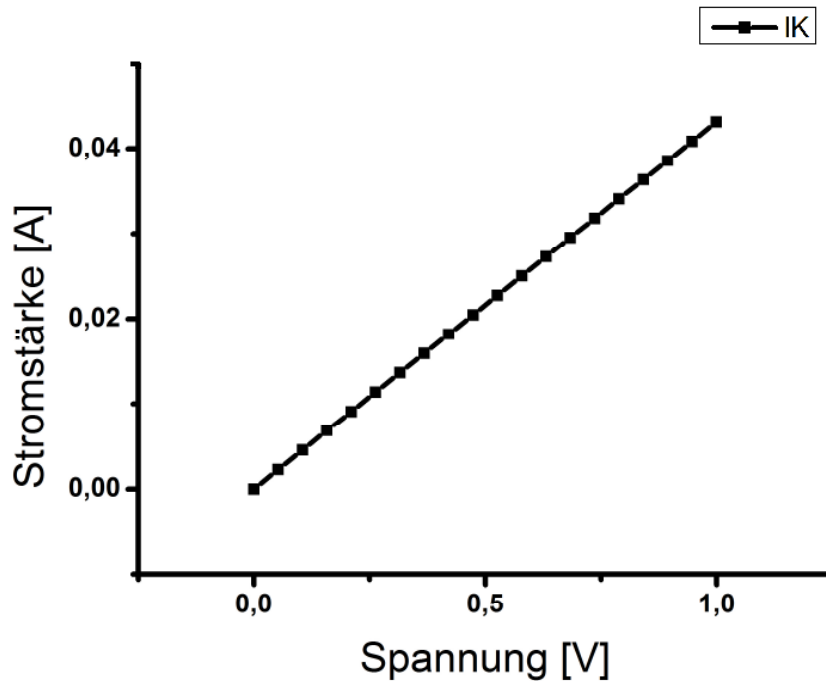


Abbildung 6-6: Strom-Spannungs-Kennlinie einer Teststruktur des Mikrochips

6.4 Herstellung des Spacers

Unter der Bezeichnung Spacer werden die Seitenwände der Mikrofluidik verstanden. Sie haben zum einen die Aufgabe, den korrekten Abstand zwischen dem Mikrochip und der Deckelelektrode zu gewährleisten, und sollen zum anderen die Mikrofluidik abzuschließen, sodass keine Flüssigkeit austreten kann. Als weitere Voraussetzung für die Eignung eines Materials als Spacer gilt die Biokompatibilität. Sie muss zwangsläufig gegeben sein, da auf dem Chip vitale biologische Zellen transportiert werden, die nach der Sortierung ihre Fähigkeit zur Kultivierung beibehalten sollen. Für den Aufbau einer 30 μm hohen Mikrofluidik standen im Wesentlichen drei Optionen zur Verfügung. Einerseits bot sich der Negativ-Lack SU-8 an [64], andererseits der Positiv-Lack AZ 10XT. In der Literatur war als dritte Variante Tape-Band als Werkstoff zur Herstellung von digitalen mikrofluidischen Systemen zu finden [65]. Aufgrund der problematischen Verarbeitung des Bandes, insbesondere bei der Justierung in Refe-

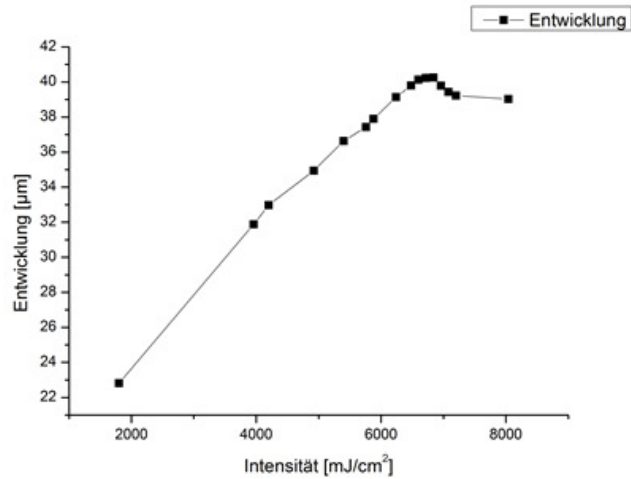
renz zu den Kontaktpads, wurde diese Möglichkeit jedoch von Beginn an ausgeschlossen und nicht erprobt.

6.4.1 Verarbeitung des Positiv-Fotolacks AZ 10XT als Spacer-Material

Der Positiv-Fotolack AZ 10XT (AZ Electronic Materials) ist generell zur Bildung von Schichtdicken zwischen 5 μm und 25 μm geeignet. Um die Zielschichtdicke von 30 μm zu erreichen, war es notwendig, den Lack in mehreren übereinander liegenden Schichten aufzutragen. Generell wurden 2 Beschichtungsschritte zur Herstellung des Spacers in einem automatischen Belacker (Maximus 804, ATM) durchgeführt. Im ersten Abschnitt wurde der Wafer bei 205 °C ausgeheizt, um daraufhin Hexamethyldisilazan als Haftvermittler zu applizieren. Im Anschluss erfolgte die erste Belackung bei 850 rpm. Der Wafer wurde anschließend für 30 Minuten ruhen gelassen, danach einem 5-minütigen Heizschritt ausgesetzt, um schließlich die zweite Lackschicht aufzutragen. Die Applikation erfolgte zum einen bei 850 rpm und zum anderen bei 2800 rpm. Wiederum folgte eine 30 minütige Standzeit und schließlich die Randentlackung bei 850 rpm. Nach einem Tag Wartezeit wurde der Lack mit Hilfe eines Steppers (PAS5500, ASML) belichtet. Die Entwicklung erfolgte unter Verwendung eines TMAH haltigen Entwicklers (AZ 826 MIF). Die Schichtdicke wurde mit Hilfe eines Profilometers (Surface Profiler P-16, KLA-Tencor) bestimmt.

Durch Variation der Belichtungsintensität wurde bei beiden Experimenten die Belichtungs-dosis bestimmt, die nötig ist, um den Lack bis auf das Substrat durch zu entwickeln. Es zeigte sich, dass bei einem zweiten Belackungsschritt, der bei 850 rpm ausgeführt wurde, eine Schichtdicke von ca. 39 μm erreicht werden konnte und dass eine Belichtungs-dosis von ca. 6800 mJ/cm^2 ausreichte, um eine Belichtung durchzuführen (Abb. 6-7 a). Hingegen erzeugte eine Belackung mit 2800 rpm eine Lackdicke von 27 μm , und die optimale Belichtungs-dosis hatte einen Wert von ca. 2700 mJ/cm^2 (Abb. 6-7 b). Bei einer Unterbelichtung könnten die substratnahen Bereiche zu wenig Licht bekommen, um durch-zuentwickeln und bei einer Überbelichtung kann reflektiertes Licht vom Substrat ebenfalls auf maskierte Bereiche des Wafers gelangen, sodass die zu entwickelnden Strukturen größer werden als vorgesehen.

a)



b)

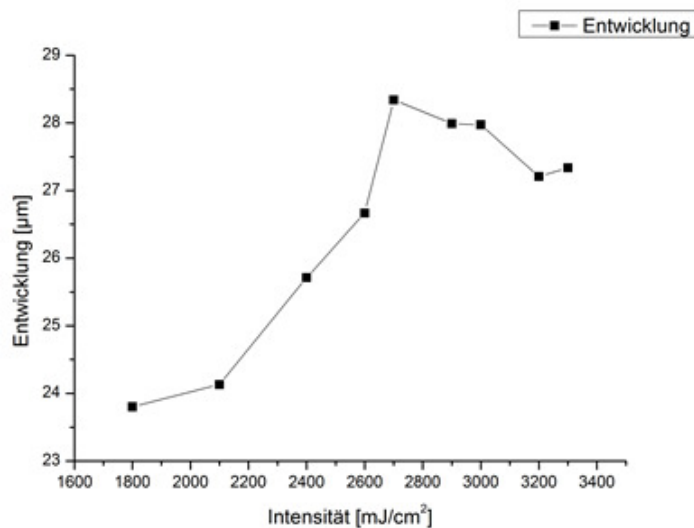


Abbildung 6-7: Auftragung der Entwicklungstiefe in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität für Lackdicken von a) 27 µm und b) 39 µm.

Bei der Betrachtung der Entwicklungstiefen fällt auf, dass, nachdem die maximale Tiefe erreicht wurde, die Höhe der Lackstufe wieder abnimmt. Als Ursache kann eine Inhomogenität der Lackschicht genannt werden. Die Messpunkte, die eine Belichtung mit hohen Belichtungsintensitäten erfuhren, lagen am Rand des Wafers. Die mittleren Intensitäten befanden sich eher in zentraler Position und verstärkten sich in Richtung des Randes. Die Messstelle der optimalen Belichtungsdosis befand sich nicht auf dem äußersten Rand des Wafers und wies eine

höhere Lackdicke als die folgenden Messpunkte auf. Demzufolge waren die intensiver bestrahlten Stellen zwar durchentwickelt, zeigten aber aufgrund der Inhomogenität eine geringere Entwicklungstiefe.

Nach der Bestimmung der optimalen Belichtungsdosis wurden REM-Aufnahmen zur zusätzlichen Bestimmung der Höhe und der Homogenität des Spacers gemacht (Abb. 6-8). Die durch die REM-Aufnahmen bestimmte Höhe beträgt lediglich $21,3\text{ }\mu\text{m}$, wohingegen die Messung am Profilometer eine Höhe von ca. $27\text{ }\mu\text{m}$ ergab. Es ist zu vermuten, dass diese Höhendifferenz aufgrund elektrischer Aufladungen des Spacers durch den Elektronenstrahl des Rasterelektronenmikroskops zu Stande kommt. Dieses Phänomen könnte eine Verzerrung des Bildes verursachen, die eine korrekte Höhenbestimmung verhindert.

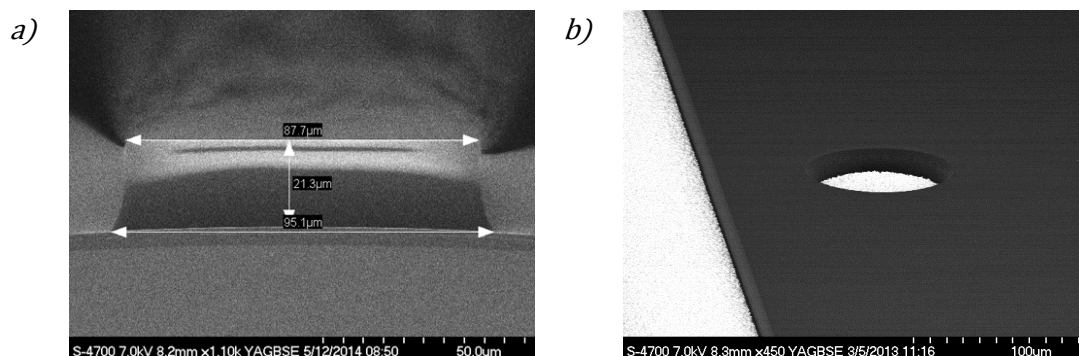


Abbildung 6-8: a) Ansicht des Höhenprofils des Spacers, bei dem eine Höhe von $21,3\text{ }\mu\text{m}$, eine obere Breite von $87,7\text{ }\mu\text{m}$ und eine untere Breite von $95,1\text{ }\mu\text{m}$ bestimmt wurde. b) Die Aufsicht auf den Spacer zeigt, dass der Lack homogen und mit einer ausreichenden Flankensteilheit abgeschieden wurde.

Die Versuche bezüglich der Nutzbarkeit des Dicklacks ließen den Schluss zu, dass das Material für den Aufbau der Mikrofluidik geeignet war, und somit wurde im nächsten Schritt eine Abscheidung auf einem strukturierten Wafer vorgenommen. Das verwendete Rezept war auf eine Spacerhöhe von $27\text{ }\mu\text{m}$ ausgelegt. Die Überprüfung der Abscheidung erfolgte optisch an einem Mikroskop. Es zeigte sich, dass der Spacer korrekt auf dem Chip positioniert wurde, sodass sich beispielsweise die Reservoirs korrekt ausbildeten (Abb. 6-9 a). Die Betrachtung der Kontaktpads ergab allerdings, dass die oberste Aluminiumschicht Defekte aufwies. Auch Messungen der Strom-Spannungs-Kennlinien an

der Teststruktur zeugten von einer verminderten Funktionsfähigkeit, da die Messkurven deutlich von dem Verhalten eines Ohmschen Widerstandes abwichen.

Die Defekte auf den Aluminiumpads resultieren aus dem Einsatz eines Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) haltigen Entwicklers. Der Inhaltsstoff besitzt die Fähigkeit, Aluminium zu ätzen und griff somit auch die Kontaktpads an. Vor allem musste aufgrund der Lackdicke der Entwicklungsschritt häufiger durchgeführt werden, sodass bei jeder Wiederholung auch eine Abtragung der Aluminiumschicht der Pads stattfand.

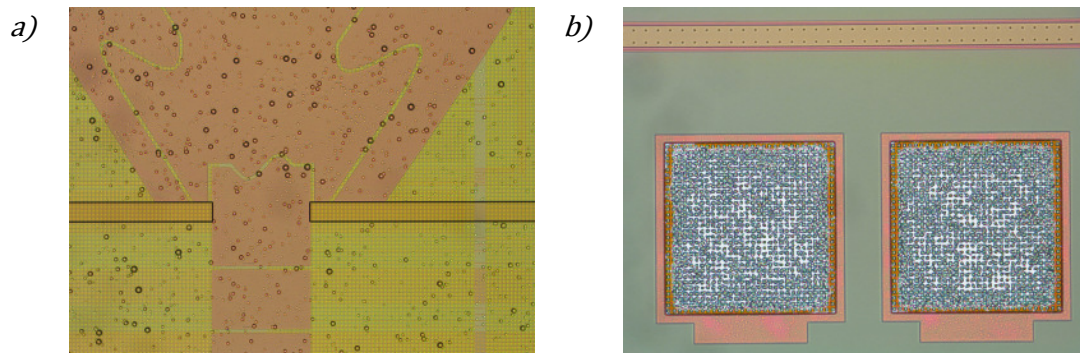


Abbildung 6-9: a) Mikroskop-Aufnahme eines abgeschiedenen Spacers. Der Spacer grenzt das Reservoir von dem Elektrodenarray ab, sodass lediglich eine Verbindung zwischen den Reservoirelektroden und den Generierelektroden bestehen bleibt. b) Beschädigte Kontaktpads nach der Entwicklung mit einem TMAH haltigen Entwickler.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Lack zwar die Anforderungen hinsichtlich der benötigten Wandhöhe und Materialbeständigkeit erfüllt, jedoch schließt die alternativlose Verwendung eines TMAH-haltigen Entwicklers eine standardmäßige Fabrikation aus.

6.4.2 Verarbeitung des Negativ-Fotolacks SU-8 als Spacer-Material

Nach Herstellerangaben bietet der Negativ-Fotolack SU-8 eine gute Haftung auf dem Substrat, eine Möglichkeit vertikale Seitenwände mit einem hohen Aspektverhältnis zu konstruieren und eine Langzeitstabilität bei dem Einsatz des Materials innerhalb von mikroeletromechanischen Systemen (MEMS). Des Weiteren

ren ist SU-8 aufgrund der guten Biokompatibilität unkritisch im Zusammenhang mit der Verwendung biologischer Proben [66].

Die Verarbeitung des SU-8 begann mit der Abfüllung von 10 ml Lack in einen 10 ml Messkolben (Duran Group GmbH). Ein Verschluss mit Aluminiumfolie und eine eintägige Standzeit garantierte eine luftblasenfreie Lösung. Ein zehnminütiger Heizschritt bei 95 °C auf einer Heizplatte entzog dem Siliziumwafer potentiell vorhandene Feuchtigkeit. Die Auftragung des Lacks aus dem Messkolben auf den ruhenden Wafer erfolgte in einem manuellen Spincoater (WS-650-8B, Laurell Technologies Corporation). Durch eine beschleunigte Drehbewegung von 100 rpm/s erreichte der Wafer eine Rotationsgeschwindigkeit von 500 rpm und somit verteilte sich der Lack auf der Oberfläche des Substrates. Der nächste Schritt beinhaltete einen Anstieg der Rotationsgeschwindigkeit auf 2350 rpm bei einer Beschleunigung von 300 rpm/s, woraufhin sich innerhalb von 36 s die Zielschichtdicke von 30 µm einstellte. Die Rückseitenentlackung dauerte 25 s und wurde bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 800 rpm durchgeführt, indem ein PGMEA haltiger Entwickler (AZ EBR Solvent, MicroChemicals GmbH) über eine Spritze durch eine dafür vorgesehene Öffnung auf die Rückseite des Wafers appliziert wurde. Nach einer einstündigen horizontalen Lagerung zur Entspannung des Materials wurden die weiteren Arbeitsschritte auf einem automatischen Belacker (IOS. CUBE, I.O.S. Instruments) durchgeführt. Um Lösemittel aus dem Lack zu treiben, fand zunächst eine siebenminütige Temperung bei 65 °C statt („Pre-Bake“). Unter Verwendung des Entwicklers AZ EBR wurde eine Randentlackung bei 800 rpm durchgeführt. Mögliche Lösungsmittelrückstände wurden bei einer Drehgeschwindigkeit von 1250 rpm entfernt.

Eine weitere Trocknung des Lacks ergab sich durch einen „Soft Bake“ bei 95 °C und einer Dauer von 13 Minuten. Die Vernetzung der monomeren Bestandteile innerhalb der belichteten Bereiche des Lacks initiierte eine 8s dauernde UV-Belichtung auf einem Mask-Aligner (Mask Aligner MA150e, SüssMicroTec).

Die Justierung der Dunkelfeld-Maske wurde anhand eines Justierkreuzes vorgenommen, das sich in der Metallebene Mtl. 5 befand.

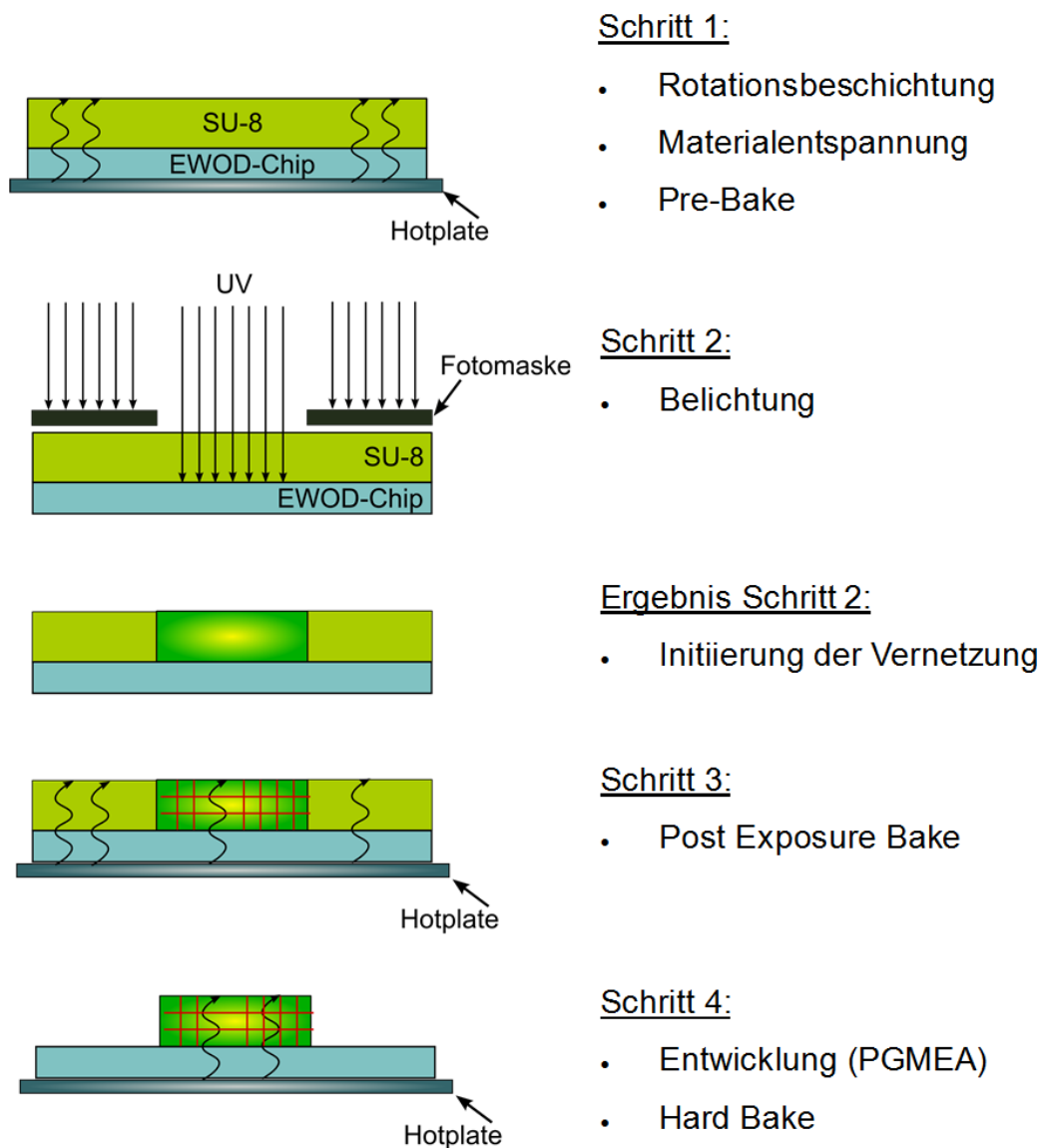


Abbildung 6-10: Darstellung des SU-8 Verarbeitungsprozesses. Nach der Rotationsbeschichtung erfolgt eine UV-Belichtung, welche die Vernetzungsreaktion initiiert. Durch den Post Exposure Bake wird die Vernetzung beschleunigt, bis die Reaktion nach ca. 4 Stunden endet. Der Entwickler entfernt den unbelichteten Lack und ein Hard Bake vermeidet die Bildung von Rissen.

Die Zeit des anschließenden „Post Exposure Bake“ belief sich auf 5 Minuten bei einer Temperatur von 95 °C. Der Temperaturschritt nach der Belichtung beschleunigte die Vernetzungsreaktion, die nach einer 4 stündigen Lagerung des Wafers bei Raumtemperatur weitestgehend endete. Bei der folgenden Entwick-

lung kam wiederum AZ EBR zum Einsatz, wobei das Lösungsmittel in mehrmaligen Schritten über die komplette Waferoberfläche verteilt und wieder herunter geschleudert wurde. Ein „Hardbake“ bei einer Temperatur von 200 C° und einer Dauer von 5 Minuten sorgte letztlich für eine zusätzliche Entspannung des Materials und vermied die Bildung von Rissen. Um thermischen Stress durch ein zu schnelles Abkühlen des Lacks zu verhindern, wurde ein 1 minütiger Temperaturschritt eingefügt, bevor sich der Wafer bei Raumtemperatur lagern ließ. Die Schichtdicke des Spacers wurde mit einem Profilometer (Surface Profiler P-16, KLA-Tencor) und einem 3D-Mikroskop (Photomap 3D optical profiler, Fogale nanotech) bestimmt.

Anhand der Teststrukturen zeigte sich, dass der Spacer präzise zu den Elektroden des Mikrochips ausgerichtet war. Auf der Abbildung 6-11 a sind Nonien zu erkennen, die diese Aussage unterstützen. Die Strukturen, die dort als BB bezeichnet werden, liegen in der Metallebene der Elektroden, während die als SU bezeichneten Strukturen aus SU-8 bestehen. Auf der Aufnahme lässt sich keine Verschiebung zwischen den beiden Ebenen erkennen, sodass von einer korrekten Justierung des Spacers ausgegangen werden kann.

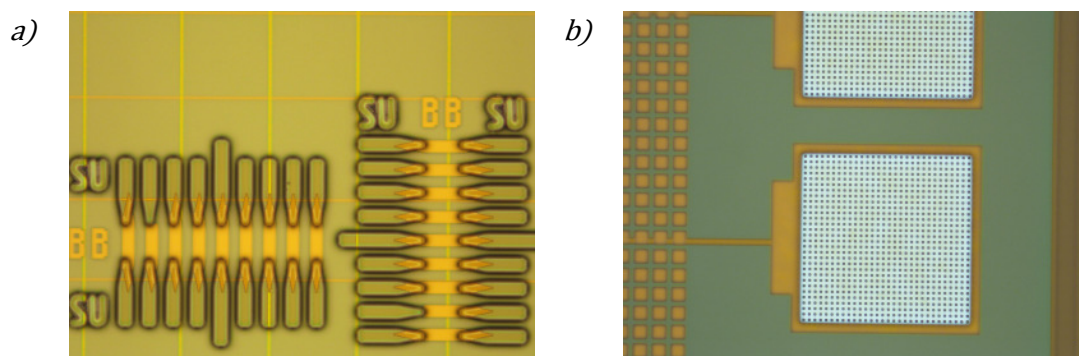


Abbildung 6-11: a) Mikroskop-Aufnahme von Nonien die sich zum einen in der Metallebene der Elektroden und zum anderen in der Ebene des SU-8 Spacers befinden. Da die Strukturen beider Ebenen nicht gegeneinander verschoben sind, kann von einer korrekten Justierung des Spacers ausgegangen werden. b) Eine Aufnahme der Kontaktpads zeigte, dass keine Beschädigungen während der SU-8 Verarbeitung entstanden.

Auf der Abbildung 6-11 b stehen die Kontaktpads im Fokus. Sie besitzen ein helles und homogenes Erscheinungsbild, woraus sich schließen lässt, dass der Herstellungsprozess die Pads nicht beschädigte.

Zur Bestimmung einer mittleren Spacerhöhe wurde mit einem Profilometer auf einem strukturierten Wafer an neun verschiedenen Messpunkten das Höhenprofil des Spacers bestimmt. Durch die Auswahl der Messpunkte wurde versucht, den Rand sowie das Zentrum des Spacers zu erfassen. Es ergab sich eine mittlere Spacerhöhe von $33,1\text{ }\mu\text{m}$ mit einer Standardabweichung von $2,6\text{ }\mu\text{m}$, und somit ließ sich der Prozess hinsichtlich des Kriteriums als anwendbar beurteilen. Das Ergebnis der Messung mit dem Profilometer konnte durch eine Untersuchung mit einem 3D-Mikroskop bestätigt werden. Auch diese Messung ergab eine Höhe des Abstandshalters von ca. $30\text{ }\mu\text{m}$. Auf der Abbildung 6-12 ist der Spacer als weißer Balken dargestellt. Die dunkelgrauen Strukturen repräsentieren die Elektroden, die durch splineförmige Gräben voneinander getrennt sind.

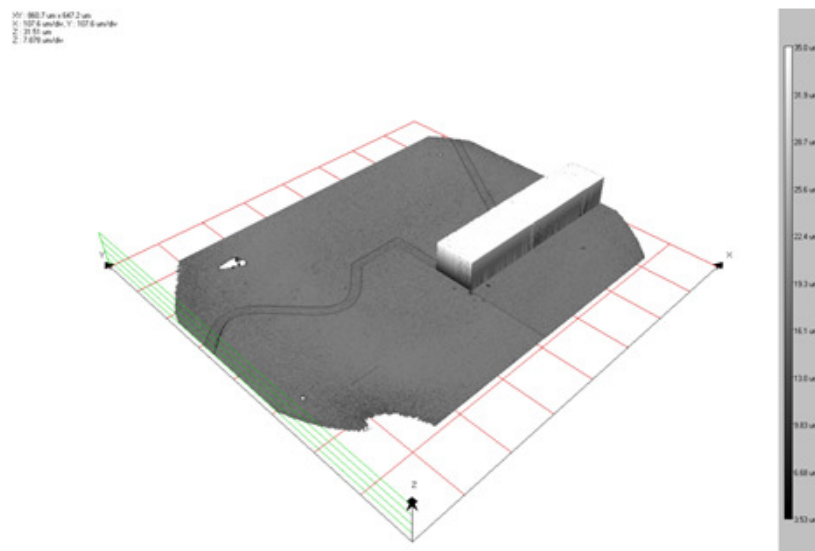


Abbildung 6-12: Aufnahme des Spacers unter dem 3D-Mikroskop.

Eine zusätzliche Aufnahme (Abb. 6-13) des gesamten Mikrochips, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops gemacht wurde, zeigt, dass der Spacer über den gesamten Bereich fehlerfrei abgeschieden worden ist.

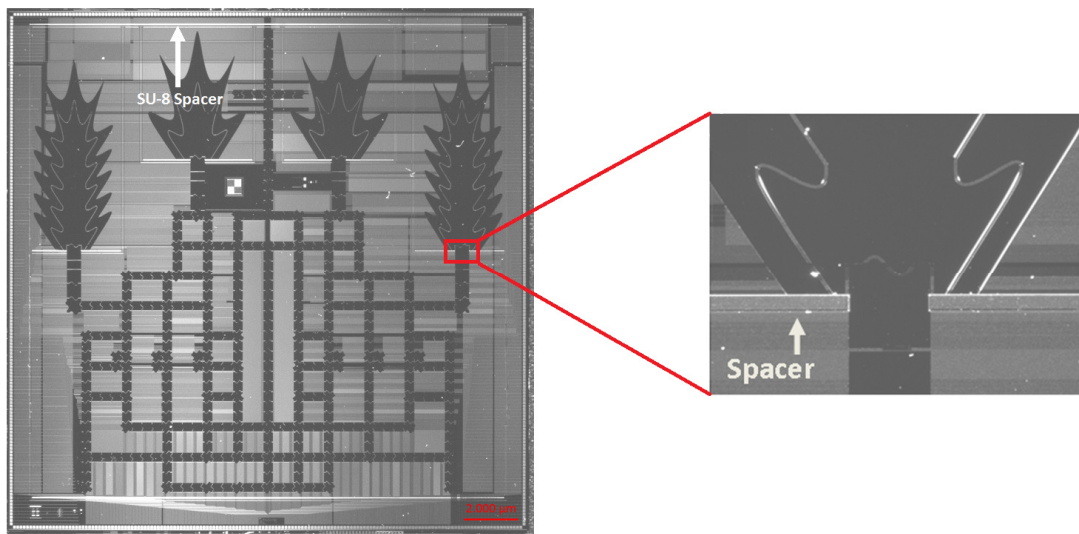


Abbildung 6-13: Aufnahme des Mikrochips inklusive abgeschiedenem SU-8 Spacer. Die Vergrößerung zeigt einen Ausgang am Reservoir, der durch den Spacer gebildet wird.

So sind zum einen helle Strukturen um die gesamte Elektrodenmatrix herum erkennbar. Zum anderen lässt sich in der Vergrößerung erkennen, dass ein Reservoir durch den Lack abgegrenzt wird.

6.5 Hydrophobisierung der Chip-Oberfläche

Die Hydrophobisierung der Oberfläche sorgt im Zusammenhang mit dem Electrowetting dafür, dass die Oberflächenspannung sowie der Kontaktwinkel zwischen der zu transportierenden Flüssigkeit und der Chipoberfläche einen möglichst großen Wert annehmen. Bei einer angelegten Spannung ändert sich der Kontaktwinkel. Vor dem Hintergrund des Kontaktwinkelmodells wird dadurch eine Kraft erzeugt, die für eine Bewegung des Tropfens sorgt.

Die Hydrophobisierung erfolgte durch das Abscheiden einer PTFE-Schicht auf die Chipoberfläche, wobei drei unterschiedliche Methoden zum Einsatz kamen. Zur Vermeidung von Teflon-Kontaminationen auf den Kontaktpads, um das Drahtbonden realisieren zu können, wurden zwei Strategien ausprobiert. So wurde versucht, das PTFE nach der Abscheidung mit Hilfe eines Sauerstoffplasmas zu entfernen sowie bereits vor der Abscheidung die Kontaktpads mit

Kaptonband zu maskieren. Zum einen wurde PTFE aus der Gasphase abgeschieden (Aixtron GmbH, Aachen) und zum anderen durch ein Tauchverfahren aufgetragen (Bartels Mikrotechnik GmbH, Dortmund). Als dritte Variante wurde ein Teil des Verfahrens des reaktiven Ionenätzens (Tegal 200, Oxford Instruments) genutzt, um PTFE abzuschneiden. Bei dem auf dem Bosch-Prozess basierenden Verfahren wird Schwefelhexafluorid (SF_6) in die Kammer eingeleitet. Ein Plasma sorgt für die Ionisierung des Gases, wobei ein elektrisches Feld die gebildeten Radikale beschleunigt und somit ein Materialabtrag entsteht. Die Einleitung von Octafluorocyclobutan (C_4F_8) unterbindet den Ätzprozess, und es bildet sich eine hydrophobe Passivierungsschicht auf dem Substrat. Beginnt der Ätzprozess von neuem, wird zuerst die waagrecht liegende Passivierung entfernt, während die Schicht an den Seitenwänden einer geätzten Struktur bestehen bleibt. So entstehen Vertiefungen, die sich nicht in waagerechter Richtung ausbreiten, sondern nur in vertikaler Richtung wachsen.

Zur Hydrophobisierung wurde lediglich der Passivierungsschritt verwendet.

Eine Messung des Kontaktwinkels mit Hilfe eines Kontaktwinkelmessgerätes (OCA 15EC, dataphysics) von Wassertropfen auf den unterschiedlichen Schichten gab Auskunft über die Eignung der jeweiligen Abscheideverfahren.

Im Allgemeinen gilt, dass bei einem großen Ausgangskontaktwinkel eines Flüssigkeitstropfens auf einer Elektrodenmatrix durch das Anlegen einer Spannung, eine große Kontaktwinkeländerung erzielt werden kann. Somit würde auch die Kraft, die den Tropfen bewegt, einen entsprechend größeren Wert annehmen. Die Beurteilung der abgeschiedenen Schichten erfolgte anhand von Kontaktwinkelmessungen, bei denen deionisiertes Wasser auf die hydrophobe Chipfläche gebracht wurde. Versuche mit PBS-Puffer zeigten, dass sich die Lösung bezüglich des Kontaktwinkels (CA) äquivalent zu dem untersuchten Wasser verhielt. Auf der Abbildung 6-14 ist das Profil eines Wassertropfens zu sehen, der von hinten beleuchtet und in derselben Ebene durch eine Kamera aufgenommen wird. Weiterhin kann man eine waagerechte Basislinie erkennen, welche an der Grenze zwischen dem Flüssigkeitstropfen und der Oberfläche verläuft. Über eine Software wurde die Kontur des Tropfens nachvollzogen, sodass der Winkel zwischen der Kontur und der Basislinie bestimmt werden konnte. Der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf einer nicht hydrophobisierten Ober-

fläche betrug 73° (Abb. 6-14 a). Wurde ein Wassertropfen auf einer PTFE-Oberfläche untersucht, die in der Gasphase abgeschieden wurde, konnte ein Kontaktwinkel von 138° gemessen werden (Abb. 6-14 b). Die im Tauchverfahren aufgebrachte Teflonschicht erreichte einen Wert von 117° (Abb. 6-14 c), und die Schicht aus dem Passivierungsschritt des Bosch-Prozesses kam auf einen Wert von 110° (Abb. 6-14 d). Insgesamt lässt sich festhalten, dass bezüglich der Kontaktwinkel sämtliche Schichten für das Electrowetting geeignet wären.

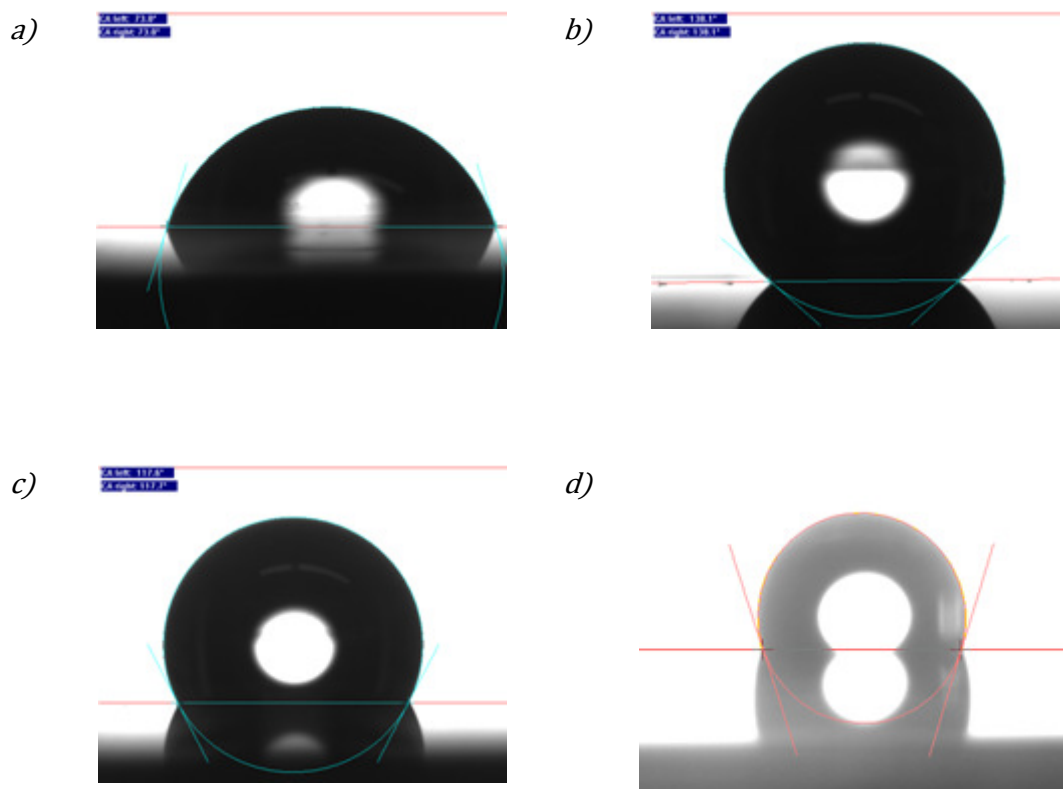


Abbildung 6-14: Kontaktwinkelmessungen auf unterschiedlichen Oberflächen: a) nicht hydrophobisierte Oberfläche $CA = 73^\circ$, b) in der Gasphase abgeschiedene PTFE-Schicht $CA = 138^\circ$, c) im Tauchverfahren abgeschiedene PTFE-Schicht $CA = 117^\circ$, d) innerhalb des Bosch-Prozess abgeschiedene PTFE-Schicht $CA = 110^\circ$

Chronologisch musste die Abscheidung der Teflonschicht vor der Befestigung des Chips auf der Platine und vor der Kontaktierung der Kontaktpads erfolgen, da der Aufbau nach diesen Arbeitsschritten nicht mehr kompatibel mit den Verfahren zur Teflonabscheidung war. Vor diesem Hintergrund war es notwendig,

die Pads entweder nach der Aufbringung des Teflons zu reinigen oder sie vor der Abscheidung zu maskieren. Für die nachträgliche Reinigung der Pads wurden ein Lösungsmittel (Fluorinert FC 40), eine Sauerstoffplasma-Behandlung und eine mechanische Reinigung mit einem Skalpell getestet. Nach den Reinigungsversuchen wurden die Chips auf Platinen geklebt, und es wurden Drahtbondversuche durchgeführt. Es zeigte sich, dass keines der genannten Verfahren für eine ausreichende Entfernung der Teflonschicht geeignet war, da sich die Drähte auf den Kontaktpads nach dem Bonden bereits durch sehr geringe Zugkräfte ablösen ließen. Außerdem konnten durch Untersuchungen der Pads nach der Sauerstoffbehandlung mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (Abb. 6-15 a) sowie mit einem 3D-Mikroskop nach der Lösungsmittelreinigung und der mechanischen Reinigung (Abb. 6-15 b) eindeutig Teflonrückstände nachgewiesen werden.

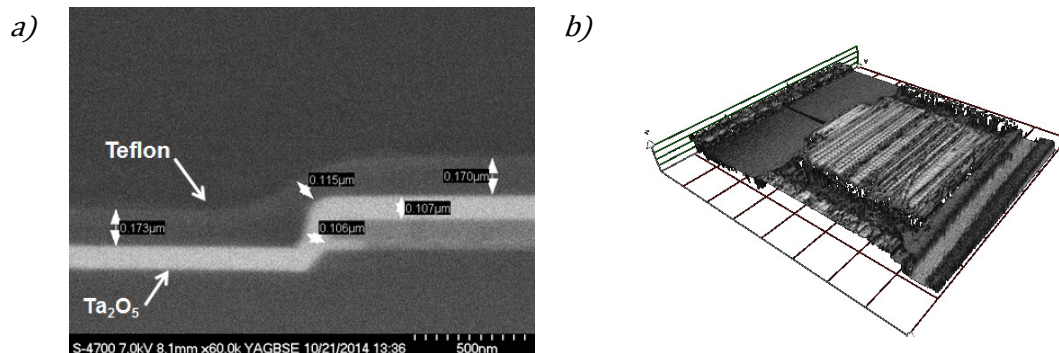


Abbildung 6-15: a) Die Untersuchung der Teflonschicht nach einer Sauerstoffplasma-Behandlung mit einem Rasterelektronenmikroskop zeigte, dass auch nach der Behandlung noch Teflonrückstände vorhanden waren. b) Das mit einem Lösungsmittel behandelte Kontaktpad wies unter dem 3D-Mikroskop ebenfalls Reste von Teflon auf.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse wurde die Strategie, die Kontaktpads vor der Teflonabscheidung zu maskieren, weiter verfolgt. Um diese Aufgabe zu erfüllen, schien Kaptonfolie eine geeignete Lösung zu sein, da das Polymer eine hohe chemische Stabilität und Hitzebeständigkeit aufweist. Die Kontaktpads wurden somit mit der Folie maskiert, während die Elektroden exponiert blieben. Es folgte die Aufbringung des PTFE und letztlich der Versuch, die Pads mit Bonddrähten zu kontaktieren.

Es zeigte sich, dass die Vorgehensweise erfolgreich war, da die Bonddrähte auch unter Ausübung größerer Zugkräfte den Belastungen stand hielten und nicht von den Pads abrissen. In der Abbildung 6-16 lassen sich zum einen die abgeklebten Pads erkennen (Abb. 6-16 a) und zum anderen die auf den Pads befestigten Bonddrähte (Abb. 6-16 b). Die Bondtests wurden auf Testplatinen durchgeführt, die nicht für jedes Pad eine Anschlussstelle bereithielten. So sind auf der Abbildung auch zunächst lediglich sechs Bonddrähte zu erkennen. Ebenfalls sichtbar ist der SU-8-Spacer, der sich als Balken rechts neben den Pads befindet.

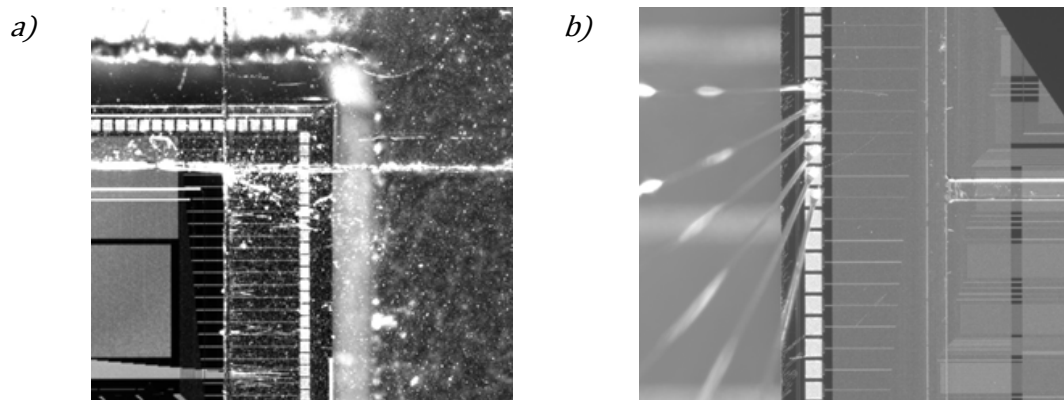


Abbildung 6-16: a) Mit Kaptonfolie maskierte Kontaktpads des Mikrochips vor der PTFE-Abscheidung. b) Durch Bonddrähte kontaktierter Chip.

Aus logistischen Gründen konnten im weiteren Verlauf des Aufbaus der EWOD-Module lediglich die durch das Tauchverfahren abgeschiedene Teflonschicht und die durch den partiell angewendeten Tiefenätzprozess aufgetragenen Schichten weiterverwertet werden. Mittels REM-Analysen konnten die Schichtdicken, die durch beide Abscheidungsverfahren erreicht wurden, bestimmt werden (Abb. 6-17).

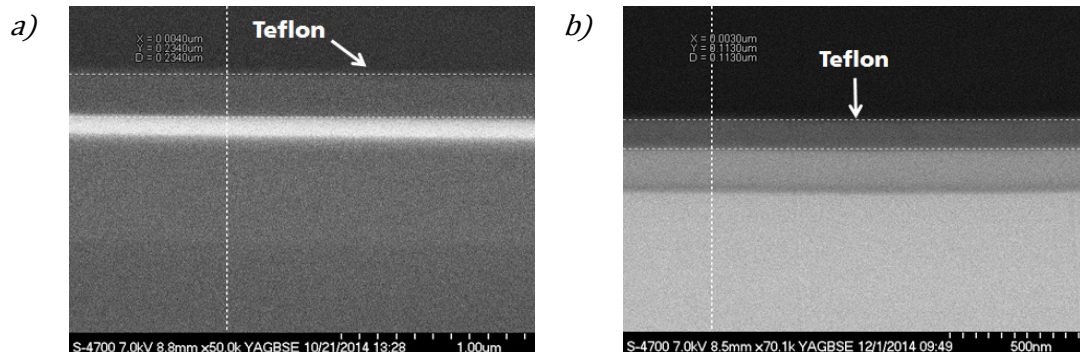


Abbildung 6-17: a) Im Tauchverfahren abgeschieden PTFE-Schicht (234 nm) b) Durch den partiellen Tiefenätzprozess abgeschiedene PTFE-Schicht (113 nm)

So stellte sich bei dem erstgenannten Verfahren eine Schichtdicke von 234 nm und bei dem zuletzt erwähnten Prozess eine Stärke von 113 nm ein. Vorgreifend auf die Experimente mit aufgebauten und angeschlossenen EWOD-Modulen erwies sich die Schicht aus dem Bosch-Prozess allerdings als wenig langzeitbeständig. So konnten Fluidoperationen gar nicht oder nur über einen kurzen Zeitraum hinweg ausgeführt werden. Eine Erklärung für die unzureichende Qualität der Schicht könnte das Abscheideverfahren liefern. Studien zeigten, dass Schichten aus fluorinierten Kohlenstoffen, die durch die Plasma-unterstützte chemische Gasphasenabscheidung (Plasma-enhanced chemical vapor deposition, PECVD) abgeschieden wurden, einen geringeren F/C Quotienten zeigten und, neben CF_2 -Gruppen, ebenfalls CF_3 - und CF -Spezies aufwiesen [67]. Außerdem traten Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen auf [68]. Weiterhin konnten vermehrt immobilisierte freie Radikale festgestellt werden, die potentiell mit atmosphärischem Sauerstoff oder Wasser reagieren können [69]. Die Reaktion kann ebenfalls als Ursache für eine vorzeitige Alterung oder für die veränderten Eigenschaften der Teflonschicht angesehen werden [70]. Sämtliche Ergebnisse der folgenden Untersuchungen basieren somit auf EWOD-Chips, die eine Teflonschicht aus einem Tauchverfahren besitzen.

6.6 Sägen und Drahtbonden der Chips

Das Sägen und Drahtbonden der Chips wurde nach standardisierten Verfahren in der Montagelinie des Fraunhofer IMS durchgeführt. Der Prozessschritt des Sägens erfolgte chronologisch vor der PTFE-Abscheidung. Das Stepp-Raster auf dem Wafer wurde so gewählt, dass ein ausreichender Abstand zwischen den einzelnen Chips lag, um diese nicht durch das Sägeblatt zu beschädigen. Der Wafer wurde auf einen Sägerahmen aufgespannt und anschließend zur Vereinzelung der Chips durch das Verfahren des Trennschleifens fragmentiert. Es folgte die PTFE-Beschichtung, bevor der Chip auf eine Platine geklebt und die Kontaktpads mit Hilfe eines standardisierten Drahtbondverfahrens durch Aluminiumdrähte mit der Leiterplatte verbunden wurden.

6.7 Justierung der Deckelelektrode und Verguss der Bonddrähte

Die Deckelelektrode besteht aus einem Glassubstrat, das einseitig mit einer leitenden ITO-Schicht und einer hydrophoben PTFE-Schicht überzogen ist. Die unterseitige ITO-Schicht wurde kontaktiert, indem von der ITO-Schicht mit Leitsilber eine leitende Verbindung zur Oberseite des Deckels hergestellt wurde, um dort einen Draht mit leitfähigem Kleber zu befestigen. Durch Anlöten des Drahtes auf die Platine ließ sich Spannung an die Elektrode anlegen. Neben Leitsilber wurde ebenfalls versucht, die ITO-Schicht mit einer Ruthenium-Schicht zu kontaktieren, die über ein ALD-Verfahren auf dem Glassubstrat abgeschieden wurde. Dieser Versuch scheiterte allerdings an der zu geringen Leitfähigkeit der Verbindung. Für die Herstellung der Anschlüsse zur Befüllung wurden Schlauchscheiben auf die Bohrungen geklebt, die in die Kanülen gesteckt wurden (Bartel Mikrotechnik GmbH). Mit Hilfe dieser Vorrichtung ließen sich Kunststoffschläuche auf den Chip aufsetzen. Die Justierung des Glasdeckels erforderte eine komplette Abdeckung des Spacers durch den Deckel, sodass keine Flüssigkeit austreten und eine Überlappung zwischen dem Glasdeckel und den bereits kontaktierten Pads vermieden werden konnte. Die Erfüllung dieser Aufgabe erforderte eine Platzierung der Deckelelektrode mit einer Toleranz von nur wenigen Mikrometern. Zusätzlich musste der Deckel vorfixiert werden, um

den Chip transportfähig zu machen, da die endgültige Fixierung zusammen mit Verguss der Bonddrähte an anderer Stelle stattfand.

Die Justierung des Glasdeckels wurde mit Hilfe eines manuellen Flip-Chip-Bonders (Fineplacer, Finetech GmbH) durchgeführt. An diesem Gerät befand sich ein Schwenkarm mit einem Vakuumkopf, an den der Deckel angebracht wurde. Der Schwenkarm befand sich zunächst in aufrechter Position, während der Chip, ebenfalls durch ein Vakuum fixiert, unter dem Schwenkarm lag. Die Ausrichtung des Deckels zu dem Chip konnte durch ein Kamerasystem realisiert werden, das die Bilder der beiden Bauteile übereinander legte. Der bewegliche Tisch, auf dem sich der Chip befand, konnte somit optimal zum Deckel positioniert werden. Im Anschluss kippte der Arm um ca. 90 ° um und drückte ohne die Bonddrähte zu berühren den Deckel mit einer Anpresskraft von 2 N und für eine Dauer von 600 s auf den Spacer des Chips. An drei Stellen, an denen sich keine Drähte oder Schlauchanschlüsse befanden, wurde der Deckel mit einem Zwei-Komponenten-Epoxidkleber (DELO-DUOPOX 1895) befestigt und für einen Tag zur Aushärtung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Bonddrähte vergossen und der Deckel gleichzeitig mit der Vergussmasse fixiert. Die Besonderheit dabei war der Einsatz unterschiedlicher Materialien.

Wie auf der Abbildung 6-18 zu sehen ist, besteht der Verguss aus zwei Komponenten. Die dunklere Masse, welche die Bonddrähte überzieht, ist ein hartes und unelastisches Material. Es schützt die Drähte vor allem vor Flüssigkeiten und mechanischen Belastungen. Das hellere Material in der Nähe des Deckels ist flexibler und verhindert, dass beim Aushärten mechanischer Stress auf den Deckel ausgeübt wird, durch den Risse entstehen könnten. Weiterhin sind die Befüllvorrichtungen für den Anschluss der Versorgungsschläuche sichtbar, wobei die vier Anschlüsse oberhalb der Reservoirs für die Medienzufuhr und die beiden unteren Schlauchscheiben für die Medienabfuhr angebracht wurden.

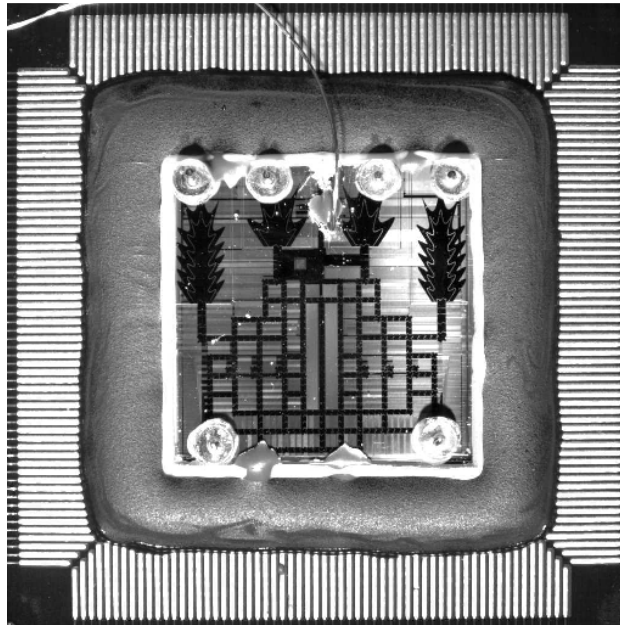


Abbildung 6-18: Abbildung eines aufgebauten EWOD-Moduls. Auf dem prozessierten Silizium-Chip befinden sich eine kontaktierte Deckelelektrode sowie Medienanschlüsse zur Befüllung. Der Deckel wird fixiert durch eine Zweikomponenten-Vergussmasse, welche gleichzeitig die Bonddrähte schützt, die zu einer Platine laufen.

Die Kontaktstelle der Deckelelektrode befindet sich zwischen den mittleren Anschlüssen der Reservoirs. Erkennbar sind dort vor allem der leitfähige Kleber und der Draht zur Kontaktierung des Deckels. Um die Vergussmasse herum verlaufen Goldkontakte, auf welche die vom Chip ausgehenden Drähte befestigt wurden. Leiterbahnen, die von den Goldkontakten zu Kontakten auf der Außenseite der Platine verlaufen, ermöglichen den Anschluss der Leiterplatte.

6.8 Anschluss der Spannungsversorgung und der Ansteuerung

Nach dem Verguss der Bonddrähte und der Fixierung des Deckels fehlten lediglich der Anschluss der Spannungsversorgung und der Ansteuerung. Die zur Bewältigung beider Aufgaben fähige Hardware (Bartels, Mikrotechnik GmbH) bestand während der ersten Experimente aus einer Platine mit einem Mikrocontroller, welcher über eine serielle Schnittstelle angesteuert werden konnte. Des Weiteren war das Bauteil in der Lage, die über einen USB-Anschluss bereitge-

stellte Spannung von 5 V in eine maximale Ausgangsspannung von 40 V zu überführen. Über Flachbandkabel wurden diese Spannungen auf Lochrasterplatten übertragen, die mit entsprechenden Steckern bestückt waren. Die Platten mit den gebondeten EWOD-Chips wurden auf Pfostenstecker gesetzt und befanden sich ebenfalls auf den Lochrasterplatten. Sie wurden über Lötverbindungen mit den Flachbandkabelsteckern verbunden, sodass durchgängige Verbindungen zwischen den Elektroden des EWOD-Chips und der Steuerplatine entstanden. An welche Elektrode ein Signal angelegt wurde, legte eine festgelegte Zeichenfolge fest, die von der Software über die serielle Schnittstelle an den Mikrocontroller übertragen wurde. Jede Stelle in der Zahlenfolge ließ sich schematisch einem Pin des Flachbandkabelsteckers zuordnen. In Abhängigkeit davon, welches Zeichen an einer bestimmten Stelle versendet wurde, konnten an die Pins drei verschiedene Zustände angelegt werden. Entweder war es möglich ein Rechtecksignal zu übertragen, ein dazu phasenverschobenes Rechtecksignal oder überhaupt kein Signal. Eine Wechselspannung zwischen einer Elektrode und dem Deckel wurde somit immer dann aufgebaut, wenn die phasenverschobenen Spannungszustände an den gegenüberliegenden Elektroden anlagen. Die Zeichenfolgen ließen sich mit Hilfe dreier unterschiedlicher Programme übertragen. Eine grafische Benutzeroberfläche bot ein Labview-Programm (Bartels Mikrotechnik GmbH) und ein eigens für das Projekt konzipiertes C# basiertes Programm (Fraunhofer IMS). Die Zeichenkette ließ sich ebenfalls über ein Makro innerhalb der Mikroskopsoftware (Zen, Zeiss AG) übermitteln. Die C# basierte Software sowie das Makro der Mikroskopsoftware ermöglichten ebenfalls die Ansteuerung des Fluoreszenzmikroskops. So waren Funktionen wie die Regelung der Fluoreszenzanregung durch Filterwechsel oder die Aufnahme von Kamerabildern in der Software implementiert und konnten für automatisierte Teilungsexperimente genutzt werden. Zur Durchführung der parallelisierten Sortierexperimente wurde der unter Abschnitt 3.4 beschriebene Aufbau verwendet (Abb. 6-19).

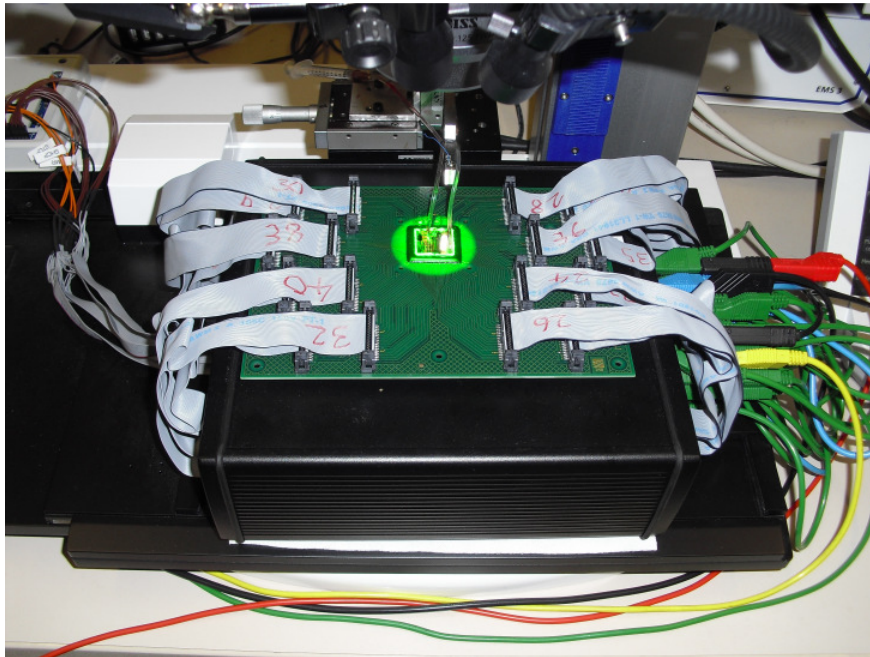


Abbildung 6-19: Foto eines angeschlossenen EWOD-Moduls. Die Platine, inklusive des Chips, ist über mehrere Flachbandkabel an die Steuerplatinen angeschlossen. Der gesamte Chip befindet sich unter einem Fluoreszenzmikroskop. Weiterhin sind zwei Schläuche erkennbar, mit denen die Reservoirs befüllt werden können.

7 Charakterisierung des Zellsortier-Chips

Die Charakterisierung des EWOD-Chips erfolgte durch die Nutzung sämtlicher zuvor beschriebener Einzelkomponenten. Zur Verfügung stand demnach ein EWOD-Chip (Funktionsmuster 2), auf dem sich Flüssigkeitstropfen nach einem programmierten Muster bewegen ließen (siehe Abschnitt 6). Die Fluidoperationen konnten durch das in Abschnitt 4.2 ausgewählte Fluoreszenzmikroskop aufgenommen werden. In die Programme zur Steuerung der Tropfenbewegung ließen sich ebenfalls die Funktionen der Fluoreszenzanregung und der Fluoreszenzdetektion integrieren. Der experimentelle Aufbau ermöglichte die Durchführung automatisierter Versuche bezüglich der Geschwindigkeit und dem Teilungsverhalten von Flüssigkeitstropfen. Außerdem konnten Sortierungsversuche anhand fluoreszierender Beads gezeigt werden.

7.1 Nachweis relevanter Fluidoperationen

Zunächst wurden sämtliche für eine Sortierung relevanten Fluidoperationen untersucht. Darunter sind die Tropfengenerierung, der Tropfentransport und die Tropfenteilung zu verstehen. Um das Auftreten von Elektrolyse zu verhindern, wurde für die Experimente angefärbtes Propylencarbonat als zu bewegendende Flüssigkeit genutzt. Als organisches Lösungsmittel benötigt es eine höhere Zersetzungsspannung als wässrige Lösungen, um eine Elektrolyse herbei zu führen [71]. Als umgebendes Medium diente Silikonöl. Zunächst wurde das Silikonöl mit einer Spritze durch die Schlauchverbindung über einem Reservoir eingefüllt. An den Elektroden lag zu diesem Zeitpunkt keine Spannung an, so dass sich das Öl im ganzen Chip verteilen konnte. Das Propylencarbonat wurde in gleicher Weise zugeführt, jedoch stand die angeschlossene Reservoir-elektrode unter Spannung, wodurch sich die Flüssigkeit im Reservoir akkumulierte. Während des ersten Schritts der Tropfengenerierung wurden die Reservoir-

elektrode abgeschaltet und die beiden folgenden Generierelektroden aktiviert. Anschließend wurde auch bei den zuvor aktivierten Elektroden die Spannung entfernt und das Potential bei der folgenden und der Reservoirelektrode angelegt.

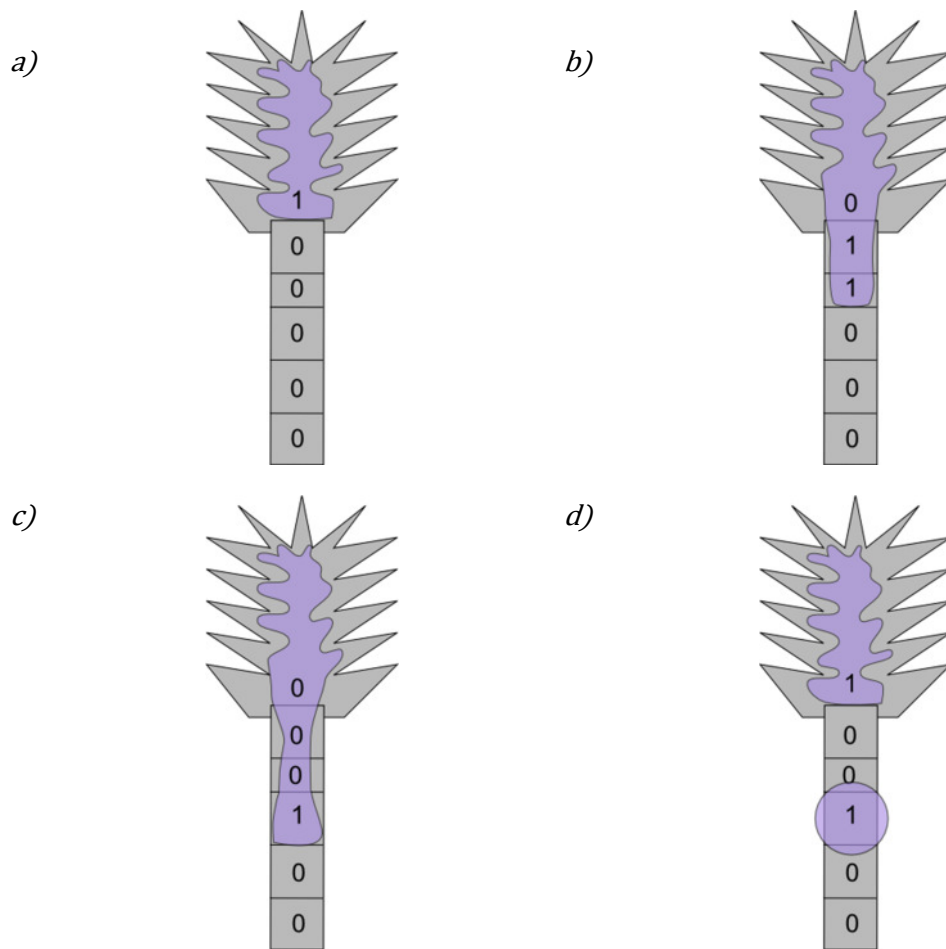


Abbildung 7-1: Elektrodenschaltungssequenz für eine Tropfengenerierung. Die Ziffer 1 beschreibt eine aktivierte Elektrode, während die Zahl 0 einen inaktiven Elektrodenzustand anzeigt. a) Die Flüssigkeit sammelt sich im Reservoir. b) Beförderung der Flüssigkeit aus dem Reservoir. c) Beginn der Abschnürung eines Tropfens. d) Extrahierter Flüssigkeitstropfen.

Um die Zuverlässigkeit der Tropfengenerierung zu untersuchen und um festzustellen, wie sich die Variation des Potentials auswirkt, wurde die Extraktion eines Tropfens bei Spannungen von 40 V, 35 V, 30 V und 25 V durchgeführt. Zu

jeder konstanten Spannung wurde ein Foto aufgenommen, die Fläche des extrahierten Tropfens gemessen und mit der Spacerhöhe von 30 μm multipliziert, um das Tropfenvolumen zu erhalten. Die Flächenmessung wurde mit einer entsprechenden Funktion der Mikroskopsoftware (Zen 2012, Zeiss AG) durchgeführt. Die Generierung des Tropfens wurde mit Hilfe des zuvor beschriebenen Elektrodenschaltungsschemas (Abb. 7-1) erreicht, wobei der generierte Tropfen nach der Extraktion wieder ins Reservoir transportiert wurde, um für jede neu beginnende Messung gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die Spannung konnte an der Steuerplatine eingestellt und mit einem Multimeter (Fluke 83, Fluke) gemessen werden, wobei dieses Prinzip auch bei sämtlichen Folgeexperimenten angewendet wurde.

Die Abbildungen 7-2 a-c zeigen den Vorgang der Tropfengenerierung auf dem Mikrochip.

Zur besseren Sichtbarkeit sind die Konturen der Flüssigkeit mit roten Linien nachgezeichnet worden. Lag eine Spannung an den Elektroden an, wurde dieser Zustand mit einer Eins gekennzeichnet, während eine Null eine inaktive Elektrode symbolisiert.

Zunächst befand sich die gesamte Flüssigkeit innerhalb des Reservoirs, da lediglich die Reservoir Elektrode eingeschaltet war (Abb. 7-2 a).

Es ist zu erkennen, dass das Propylencarbonat die geschwungene Form der inneren Elektrode ausfüllte und nicht auf die Nachbarelektroden überging. Dieses Verhalten wies bereits daraufhin, dass sich das Fluid präzise steuern ließ. Auf der nächsten Abbildung (Abb. 7-2 b) befindet sich die Flüssigkeit bereits auf den Generierelektroden. Um dorthin zu gelangen, wurde die Reservoir Elektrode abgeschaltet und die Generierelektroden sequentiell zugeschaltet. Nachdem die Flüssigkeitsfront die Elektroden passierte, wurden diese ebenfalls inaktiviert. Die Abspaltung eines Tropfens gelang durch erneutes Einschalten der Reservoir Elektrode bei gleichzeitiger Aktivierung einer Generierelektrode. In diesem Zustand wirkten zwei in unterschiedliche Richtung zeigende Kräfte auf das gesamte Flüssigkeitsvolumen, sodass es asymmetrisch geteilt wurde (Abb. 7-2 c).

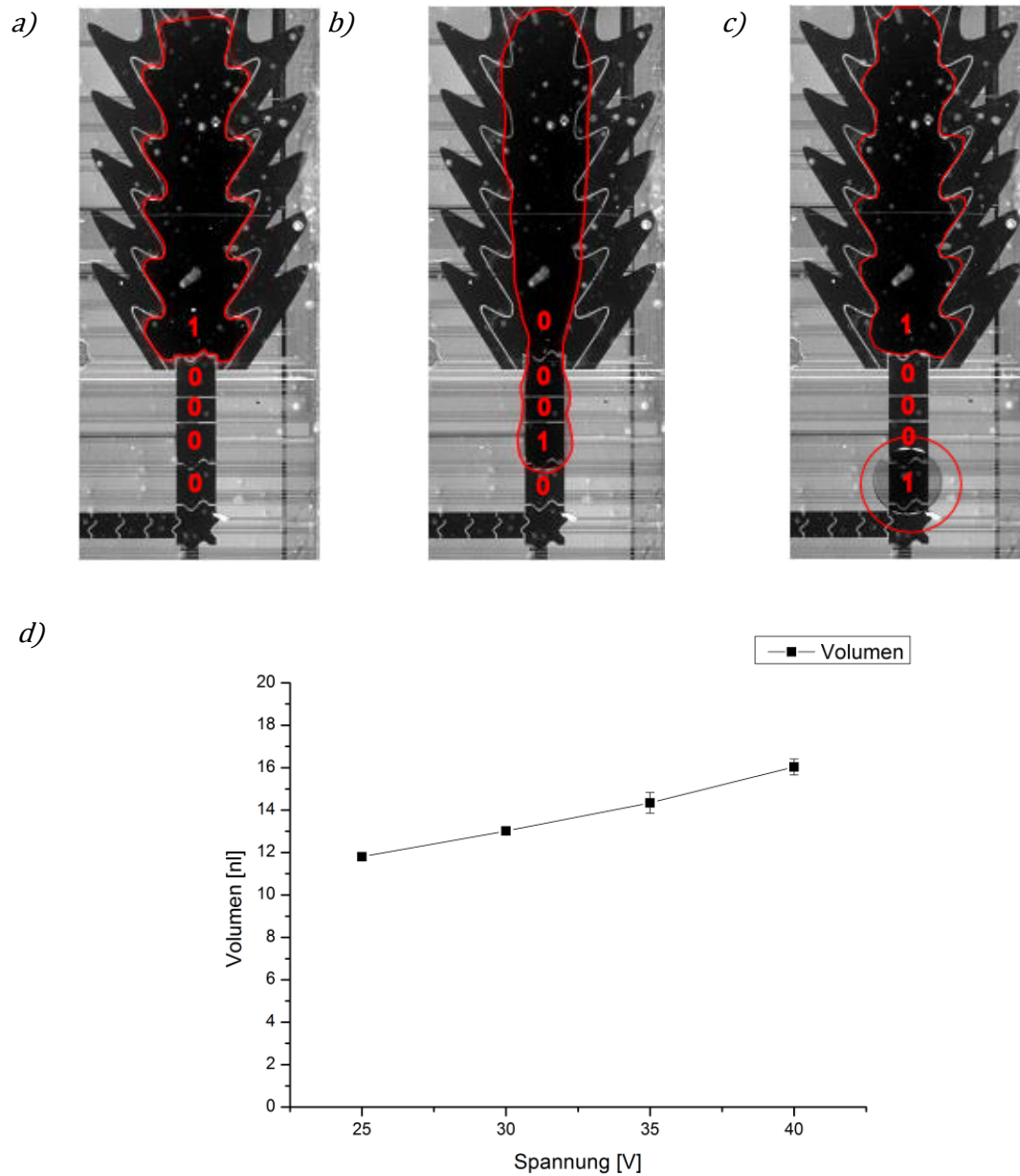


Abbildung 7-2: a-c) Aufnahme einer Tropfengenerierung auf einem EWOD-Chip. Die aktivierten Elektroden sind mit einer Eins und die inaktivierten Elektroden sind durch eine Null gekennzeichnet. d) Auftragung des generierten Tropfenvolumens gegen die dafür benötigte Spannung.

Bei einer Spannung von 25 V betrug das mittlere Tropfenvolumen 11,8 nl bei einer relativen Standardabweichung von 1,1 %. Die Durchführung der Experimente bei 30 V ergab einen Mittelwert von 13,0 nl und einen relativen Fehler

von 1 %. Eine weitere Erhöhung der Spannung auf 35 V resultierte in einem Durchschnittsvolumen von 14,3 nl und einer relativen Abweichung von 3,4 %. Letztlich ergab die Messung bei 40 V einen Mittelwert von 16,0 nl bei einer relativen Standardabweichung von 2,3 %. Der Anstieg des Volumens bei einer Anhebung der Spannung um 5 V belief sich auf 1,4 nl, wobei der relative Fehler bei 14,8 % lag [72].

Die Ergebnisse zeigen, dass bei konstanter Spannung ein Tropfen mit einem konstanten Volumen generiert werden kann. Der maximale relative Fehler von 3,4 % könnte unter Einbeziehung der Robustheit der Tropfenteilung und des Tropfentransports während einer Zellsortierung toleriert werden. Generell steigt das Tropfenvolumen mit einer Erhöhung der Spannung an. Da der Fehler des durchschnittlichen Anstiegs allerdings bei 14,8 % liegt, bliebe bei Interpolation der Daten eine gewisse Unsicherheit bestehen. Weiterhin müssten Untersuchungen mit deutlich mehr Wiederholungen durchgeführt werden, um die Aussagen zu validieren. Bei solchen Langzeitstudien könnten Effekte, wie ein Verschleiß der Materialien, zu Elektrolyse führen und den Vorgang behindern. Außerdem zeigten Electrowetting-Experimente mit Pufferlösungen, dass diese Elektrolyse hervorrufen können und somit ebenfalls die Reproduzierbarkeit der Generierung verringern. Auch der Einfluss von Partikeln und biologischen Zellen bietet die Gelegenheit zu weiterer Forschung.

Neben der Generierung sind der Tropfentransport und die Tropfenteilung wichtige Bestandteile der Zellsortierung. Der Tropfentransport wurde ausgeführt, indem die Elektrode, auf der sich der Tropfen befand, inaktiviert und die angrenzende Elektrode aktiviert wurde. Für eine Teilung wurden drei sequentiell aufeinanderfolgende Elektroden benutzt.

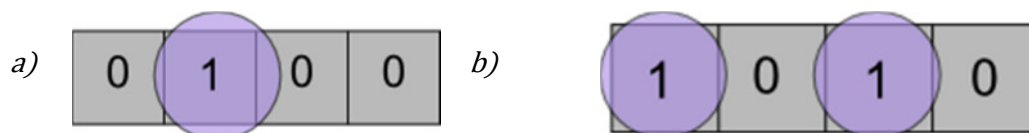


Abbildung 7-3: Elektrodenschaltung während einer Tropfenteilung. Die Zahl 1 steht für eine aktivierte Elektrode, und die Zahl 0 zeigt eine abgeschaltete Elektrode an. a) Der Flüssigkeitstropfen ist auf einer eingeschalteten Elektrode fixiert. b) Durch das Einschalten der beiden seitlichen Elektroden, bei gleichzeitiger Inaktivierung der mittleren Elektrode, wird der Tropfen in zwei kleinere Tropfen aufgeteilt.

Die mittlere Elektrode, auf welcher sich der Tropfen befand, wurde abgeschaltet, während die beiden äußeren Elektroden ein Potential erhielten (Abb. 7-3). Um die beiden Tropfen wieder zu vereinigen, wurde die Elektrodenschaltung in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt.

Die Tropfenteilung wurde mit dem Ziel untersucht, den Arbeitspunkt für eine möglichst symmetrische Tropfenteilung zu identifizieren, um letztlich den Sortierprozess vorhersagen und standardisieren zu können. Bei einer konstanten Spannung von 35 V, jedoch unter Verwendung unterschiedlicher Pulslängen (1000ms – 300 ms), wurden Propylencarbonat-Tropfen nach dem gezeigten Schema (Abb. 7-3) geteilt und bezüglich ihrer Fläche vermessen. Das Datenverarbeitungsprogramm OriginPro 8.1 half bei der Analyse der Daten.

Vor dem Hintergrund der Zellsortierung sind Tropfen mit gleich großen Volumen nach einer Teilung nötig, um die Teilungsschritte vorhersagbar zu gestalten. Zudem ist der Algorithmus und der Mikrochip unter der Annahme symmetrischer Teilungsvorgänge konzipiert worden. Abbildung 7-4 visualisiert die Ergebnisse der Untersuchung.

Zunächst ist eine Bildfolge dargestellt, die eine Tropfenteilung inklusive des Schaltungsschemas der Elektroden zeigt. Die Aufnahmen wurden wiederum anhand des Funktionsmusters 2 erstellt, und die Kontur der Flüssigkeit wurde mit roten Linien nachgezeichnet. Zu Beginn befand sich der Tropfen in einer Ruhelage, und lediglich die Elektrode unter der Flüssigkeit war aktiviert (Abb. 7-4 a). Nach der Zuschaltung der angrenzenden Nachbarelektroden erhielt der Tropfen eine auseinander gezogene ovale Form (Abb. 7-4 b). Die folgende Inaktivierung der mittleren Elektrode sorgte für die Entstehung entgegengesetzt wirkender Kräfte auf den Tropfen und für die Tropfenteilung (Abb. 7-4 c-d).

In der Grafik 7-4 e wurden die gemessenen Grundflächen der Tropfen gegen die Pulslängen aufgetragen, die während der Teilung an den Elektroden anlagen.

Jedes Messpunktpärchen wurde aus einem Mittelwert von fünf Messungen gebildet.

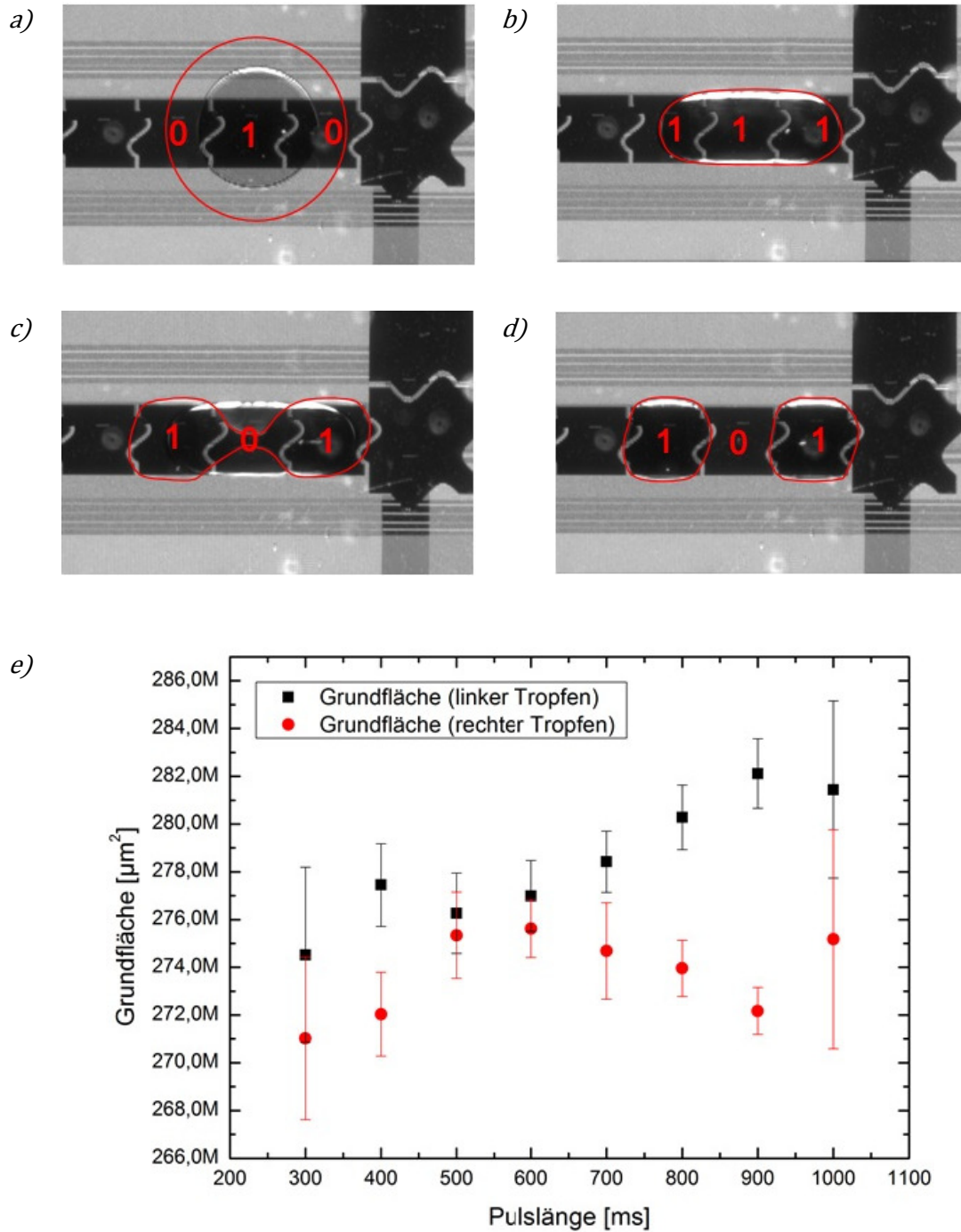


Abbildung 7-4: a-d) Sequenz einer Tropfenteilung auf dem EWOD-Chip. Der Tropfen wird zunächst auf drei Elektroden verteilt und durch die Abschaltung der mittleren Elektrode geteilt. e) Auftragung der Grundflächen der entstandenen Tropfen nach einer Teilung gegen die verwendete Länge der Spannungspulse. Eine maximale Symmetrie wird bei einer Pulslänge von 500 ms erreicht.

Generell ist ein Effekt der Pulslänge auf die Tropfenteilung erkennbar. Es zeigte sich, dass die maximale Symmetrie der Tropfenteilung bei einer Pulslänge von 500 ms lag. Dort betrug der Mittelwert der Grundfläche des linken Tropfens ca. $277 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ mit einer Standardabweichung von 0,5 %, während der rechte Tropfen eine Fläche von ca. $276 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ aufwies und einen relativen Fehler von 0,5 % besaß. Die maximale Asymmetrie trat bei einer Pulslänge von 1000 ms auf. Dort ließ sich der Größe des linken Tropfens ein Wert von $281 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ mit einer relativen Standardabweichung von 1,3 % zuordnen, während der rechte Tropfen eine durchschnittliche Grundfläche von $275 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ und eine relative Abweichung von 1,7 % zeigte [72]. Insgesamt fällt auf, dass im Bereich von 300–400 ms eine Asymmetrie der Tropfenteilung herrscht, jedoch ab 500 ms die maximale Symmetrie erreicht wird. Ab diesem Punkt vergrößert sich die Differenz der Grundflächen wieder, bis ihr größter Wert bei 1000 ms erzielt wird. Der Grund für dieses Verhalten könnte in dem Zustand vor der eigentlichen Teilung liegen, der durch die Aktivierung aller drei Elektroden gekennzeichnet ist. Es wäre vorstellbar, dass sich nur bei einer Pulsdauer von 500 ms das gleiche Flüssigkeitsvolumen auf den beiden äußeren Elektroden befindet und dass zu jeder anderen Zeit dieses Verhältnis gestört ist. Besteht schon in dieser Phase ein Ungleichgewicht, führt die Abschaltung der mittleren Elektrode zu einer asymmetrischen Teilung.

7.2 Geschwindigkeitsmessungen anhand von Flüssigkeitstropfen

Die Transportgeschwindigkeit von Flüssigkeitstropfen ist ein wichtiger Parameter, um die Leistungsfähigkeit der Zellsortieranlage zu beurteilen. Je höher die Transportgeschwindigkeit ausfällt, desto schneller können die Tropfen zwischen den Teilungsstationen und zu den Ausgängen bewegt werden. Proportional dazu steigt ebenfalls die Sortierrate.

Als Flüssigkeiten wurden wiederum Propylencarbonat und Silikonöl verwendet. Die zu bewältigende Distanz erstreckte sich über 7 Elektroden ($1937,5 \mu\text{m}$). Eine Kamera nahm den gesamten Transportvorgang mit einer Bildrate von 2,5 Bildern pro Sekunde auf. Die Zeit, die der Tropfen zur Bewältigung der Strecke benötigte, wurde bestimmt, indem die Anzahl der aufeinander folgenden

Kamerabilder durch die Bildrate dividiert wurde. Dabei beinhaltete eine Bildsequenz immer einen ruhenden Tropfen auf der Ausgangselektrode und einen bewegungslosen Tropfen auf der Zielelektrode.

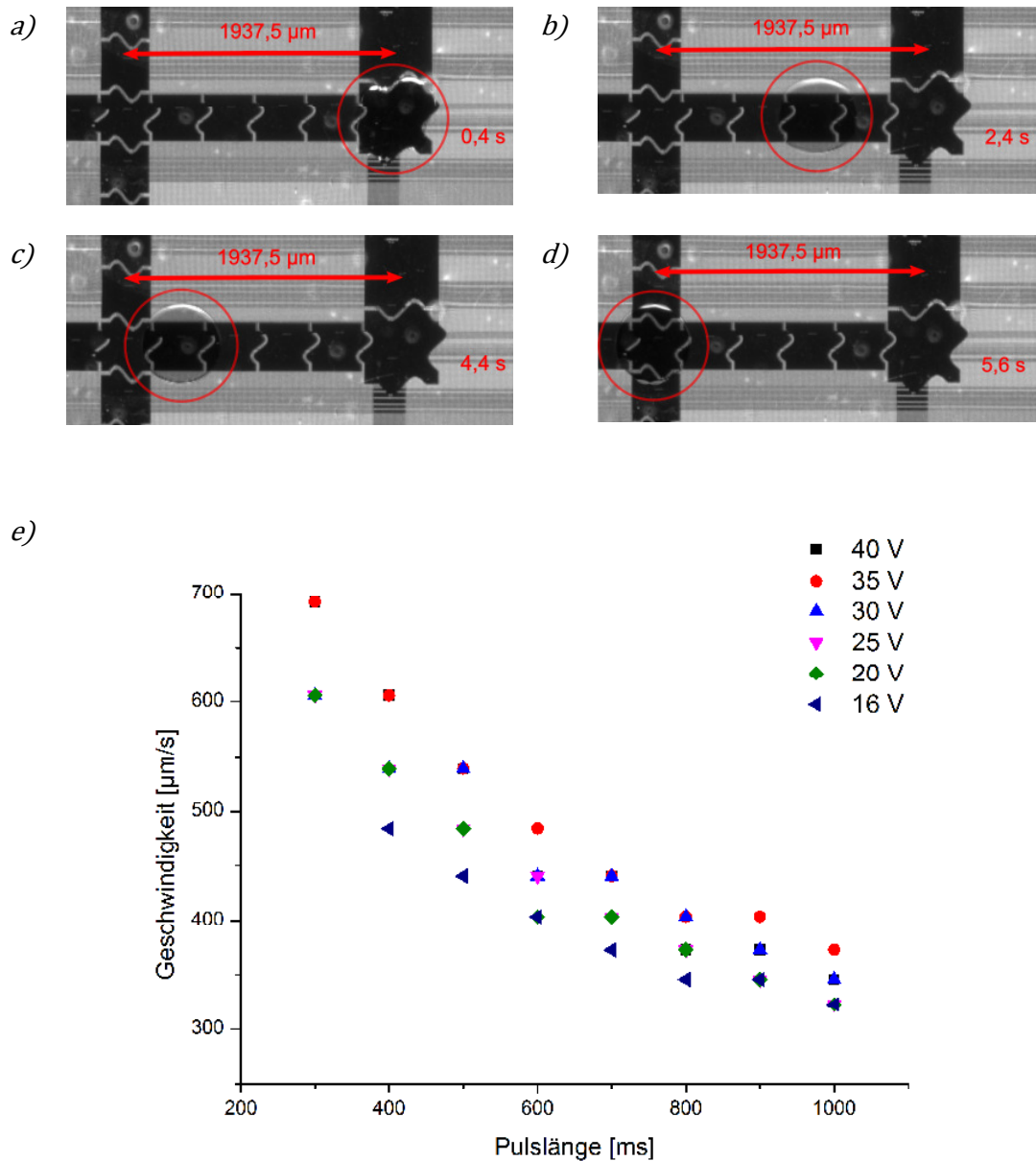


Abbildung 7-5: a-d) Sequenz einer Geschwindigkeitsmessung auf dem EWOD-Chip. Der Tropfen wird auf einer Strecke von 1937,5 μm transportiert und die dafür benötigte Zeit ermittelt. e) Auftragung der Transportgeschwindigkeit gegen die Pulslänge.

Innerhalb des Experimentes wurden zwei Parameter variiert, zum einen die Spannung und zum anderen die Pulslängen. So wurden innerhalb einer Messreihe die Spannung konstant gehalten und die Pulslängen geändert, um schließlich die Geschwindigkeiten bei verschiedenen Pulslängen gegeneinander aufzutragen. Die Messreihen wurden bei Spannungen von 40 V – 16 V durchgeführt, wobei ein Intervall von 5 V benutzt wurde. Die Änderungen der Pulslängen bewegten sich in einem Bereich von 1000-300 ms und waren in Intervallen von 100 ms gestaffelt. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen betrug die gemessene Maximalgeschwindigkeit 697 $\mu\text{m/s}$. Simulationen zeigen allerdings, dass mit einer annähernd idealen Chip-Oberfläche, einem geringeren Tropfenvolumen, einer geringeren Viskosität des Transportmediums und einem größeren Kontaktwinkel eine um den Faktor 1,8 höhere Geschwindigkeit möglich wäre. Diese könnte zusätzlich durch eine Erhöhung der Elektrodenschaltungsfrequenz gesteigert werden. Berechnungen zeigen, dass ein Tropfen 26 ms benötigt, um eine Elektrode zu passieren. Wird nach dieser Zeit direkt die nächste Elektrode aktiviert, entspräche dies einer maximalen Taktfrequenz von 38 Hz mit einer maximal anzunehmenden Tropfengeschwindigkeit von 14 mm/s [56].

Auf der Abbildung 7-5 a ist die Ausgangsposition des Tropfens angegeben.

Da die Belichtungszeit der Kamera 400 ms betrug, wird die Zeit in der das erste Bild aufgenommen wurde, bereits bei der Berechnung der Geschwindigkeit einbezogen. Der gleiche Sachverhalt gilt für die Abbildung 7-5 d, auf welcher der Tropfen sich in seiner Endposition befindet. Die Bildfolge 7-5 b und c zeigt die Positionen des Tropfens zu den Zeitpunkten 2,4 s und 4,4 s. Die beschriebenen Abbildungen entstammen einer Versuchsreihe, die bei einer Spannung von 40 V und einer Pulslänge von 1000 ms aufgenommen wurde.

In der Grafik 7-5 e sind die Tropfengeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Pulslängen und Spannungen aufgetragen. Es ist erkennbar, dass bei konstanter Spannung die Geschwindigkeit mit der Abnahme der Pulslänge zunimmt [72]. Dieses Verhalten entspricht den Erwartungen, da die kürzere Zeit zwischen den Pulsen gleichzeitig bedeutet, dass in kürzeren Abständen eine treibende Kraft auf den Tropfen ausgeübt wird. Ein ähnlicher Trend ist zu erkennen, wenn die Pulslängen konstant gehalten und dafür die Auswirkungen der Spannungsän-

derungen miteinander verglichen werden. Aus diesem Blickwinkel nimmt in den meisten Fällen die Transportgeschwindigkeit mit der angelegten Spannung zu. In Bezugnahme auf die Gleichung 2.4, welche die Druckdifferenz an Flüssigkeitstropfen innerhalb von EWOD-Systemen beschreibt, war dieser Zusammenhang ebenfalls zu erwarten. Aus dem Ausdruck geht hervor, dass die Druckdifferenz innerhalb eines Tropfens auch von der Spannung abhängt. Eine Erhöhung der angelegten Potentiale erzeugt also eine größer Druckdifferenz innerhalb des Tropfens. Somit wirken größere Kräfte während des Transports auf den Tropfen, und die Geschwindigkeit erhöht sich. Beachtenswert ist ebenfalls die Tatsache, dass bei einer Spannung von 16 V und einer Pulslänge von 300 ms der Tropfentransport zwar beginnt, jedoch verliert der Tropfen nach ca. der Hälfte des zurückgelegten Weges den Kontakt zu den Elektroden, so dass er sich in Bereiche des Chips bewegt, in denen keine elektrischen Potentiale vorhanden sind. Zur Erklärung des Ereignisses wird der Einfluss der Spannung und der Pulslänge herangezogen. Wie bereits geschildert, besitzt der Tropfen bei konstanter Spannung und einer Pulslänge von 300 ms seine maximale Geschwindigkeit. Das bedeutet zudem, dass sein Impuls ebenfalls maximal ist. Unter der Voraussetzung, dass bei genannter Pulslänge die konstante Spannung 16 V beträgt, liegen für einen kurzen Zeitraum relativ schwache elektrische Felder an den Elektroden an. Es lässt sich vermuten, dass die Kombination aus hohem Impuls des Tropfens und relativ kurzen und schwachen Spannungspulsen dazu führt, dass der Tropfen nicht mehr auf den Elektroden fixiert werden kann und sich somit von der Strecke entfernt. Das in der Grafik 7-5 einzelne Messpunkte übereinander liegen und sich die spannungsabhängige Geschwindigkeitserhöhung nicht vollständig auflösen lässt, hängt mit der beschriebenen Messmethode zusammen. Eine Bildaufnahmerate von 2,5 Hz reichte nicht aus, um die Auswirkungen der Parametervariation vollständig zu erfassen. Eine Erhöhung der Abtastrate durch eine Steigerung der Bildaufnahmerate würde einen detaillierteren Einblick auf den Transportvorgang liefern.

7.3 Bestimmung von Partikelverteilungen

Die Bestimmung von Partikelverteilungen kann ebenfalls Hinweise auf die Effizienz der Sortieranlage liefern. Vor diesem Hintergrund ist es von Bedeutung zu wissen, wie sich Partikel innerhalb eines Flüssigkeitstropfens verhalten und wie sich eine Partikelpopulation nach einer Tropfentrennung auf die entstandenen Tropfen aufteilt. Von diesen Beobachtungen hängt es ab, wie viele Teilungsschritte tatsächlich durchgeführt werden müssen, um eine reine Zellsuspension herzustellen. Da Propylencarbonat kaum Elektrolyse hervorruft, wurde die Chemikalie erneut eingesetzt. Jedoch bestand die Herausforderung in diesem Fall darin, die fluoreszierenden Beads in dem Medium zu verteilen, da sie unbehandelt sofort agglomerierten. Um eine Lösung mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Beads herzustellen, wurden 100 ml Propylencarbonat in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt und je 2 μ l unterschiedlich fluoreszierender Beads (ThermoFisher SCIENTIFIC) hinzugegeben. Nach der Verabreichung von ca. 1 μ l Tween 20 (Sigma Aldrich) begannen die Partikel zu emulgieren [51]. Eine vollständige Verteilung konnte schließlich durch eine 2 minütige Zentrifugation (Mikro 200R, Hettich) bei 2500 rpm erzielt werden. Durch eine an die Anschlüsse der Mikrofluidik gekoppelte Spritze gelangte die partikelhaltige Lösung in das Reservoir. Zwei unterschiedliche Filtersätze ermöglichten die Diskriminierung beider Spezies. Ein Filtersatz regte die Fluoreszenz bei 470 nm an und ließ Licht bei einer Wellenlänge von 525 nm passieren, während der andere Filter für eine Anregung bei 550 nm und eine Messung bei 605 nm sorgte. Die Experimente begannen mit einer Tropfenextraktion und einem Transport des beadhaltigen Tropfens in eine Ausgangsposition, von der aus jede Teilung startete. Demnach wurde für jede Teilung immer der gleiche Tropfen benutzt, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Aus der Ausgangsposition wurde der Tropfen auf eine Strecke mit mehreren aufeinanderfolgenden Elektroden geführt, um in der Mitte geteilt zu werden. Zwei Kamerabilder mit unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern wurden vor und nach der Teilung des Tropfens aufgenommen. Das Experiment wurde zunächst mit 20 Durchläufen und manueller Bedienung der Kamera und des Filterwechsels durchgeführt. In einem weiteren Schritt konnten die manuellen Funktionen in das Steuerprogramm aufgenom-

men und das Experiment automatisiert mit einer Anzahl von 350 Durchläufen wiederholt werden. Die Anzahl der Partikel auf den Bildern der manuell durchgeführten Experimente wurde ebenfalls manuell bestimmt, während die Auswertung des automatisierten Experimentes computergestützt verlief.

Auf der Abbildung 7-6 a-b ist ein Flüssigkeitstropfen mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Partikelspezies vor und nach einer Teilung erkennbar.

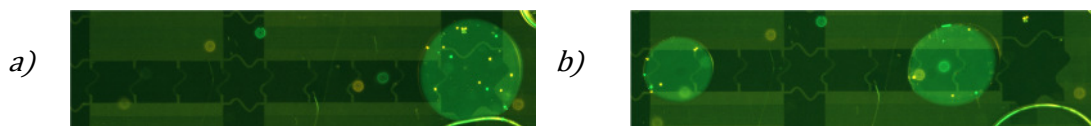


Abbildung 7-6: Mikroskop-Aufnahme eines Propylencarbonat-Tropfens mit zwei unterschiedlichen Bead-Spezies a) vor und b) nach einer Tropfenteilung.

Die Partikel werden zur besseren Verständlichkeit in der Auswertung der Experimente als grüne oder orange Partikel bezeichnet, wobei sich dahinter jeweils ein spezifischer Filtersatz verbirgt. Die Filtersätze sind der Tabelle 7.1 (siehe Abschnitt 7.5) zu entnehmen. Es wurden zur Aufnahme der grünen Partikel der Filtersatz 38 HE und zur Detektion der orangenen Partikel der Filtersatz 43 HE benutzt. Die Abbildung 7-7 a-b gibt die Verteilungen der Partikel nach einer Tropfenteilung bei manueller Versuchsdurchführung wieder und zeigt eine exemplarische Kurvenanpassung eines Histogramms durch eine Normalverteilung. In dem Teilungsexperiment befanden sich 8 orangene und 5 grüne Partikel im Ausgangstropfen. Die Partikelverteilung und die Anpassung eines Histogramms der automatisiert durchgeführten Versuche sind auf der Abbildung 7-8 a-b dargestellt. Während der Experimente beinhaltete der Ausgangstropfen 13 orangene und 5 grüne Partikel. Ein Vergleich beider Experimente bezüglich der Symmetrie der Partikelverteilung auf die geteilten Tropfen ließ erkennen, dass mit einer zunehmenden Anzahl an Versuchen die Symmetrie der Verteilung zunahm und gegen das erwartete Verhältnis von 50:50 konvergierte. So lagen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Partikelanzahlen in beiden Tropfen bei dem manuellen Experiment bei $5 \pm 1,8$ und $8 \pm 1,7$. Das automatisierte Experiment zeigte hingegen Werte von $7,9 \pm 3,5$ und $7,2 \pm 2$.

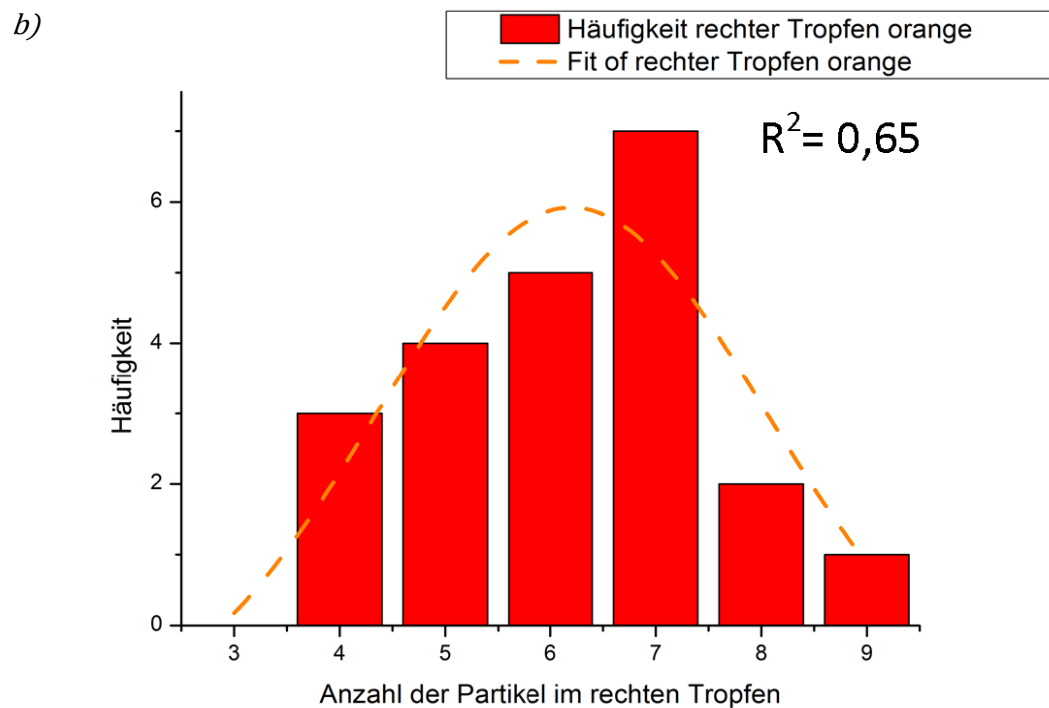
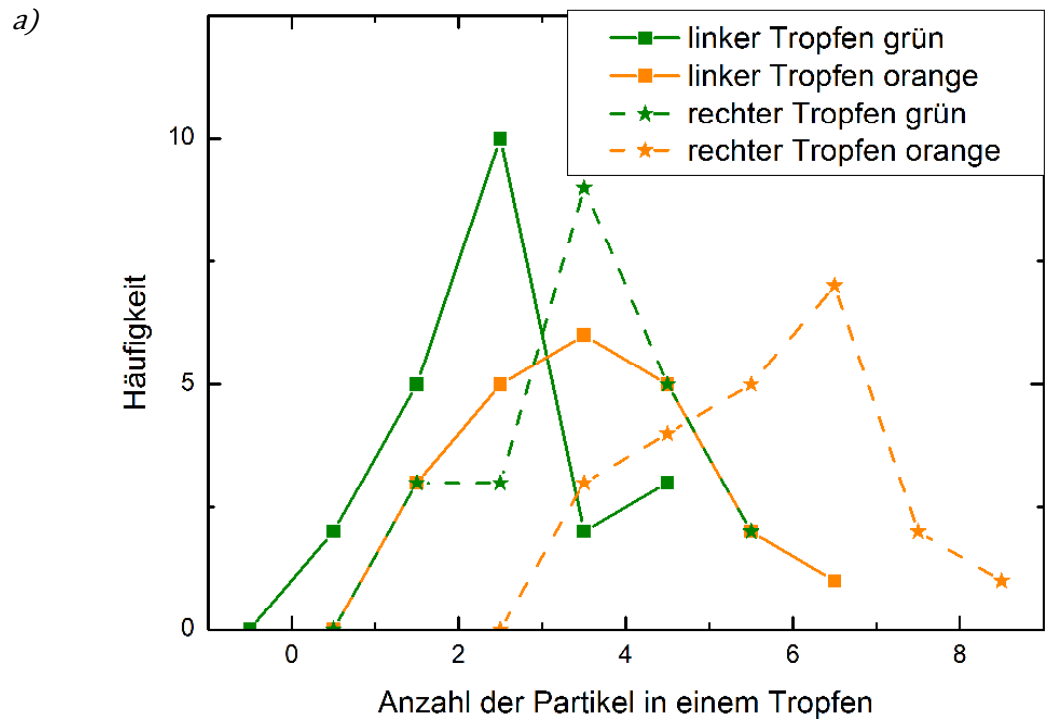


Abbildung 7-7: a) Verteilung zweier unterschiedlich fluoreszierender Partikel-spezies eines manuell durchgeführten Teilungsexperimentes und b) eine exemplarische Kurvenanpassung durch eine Normalverteilung.

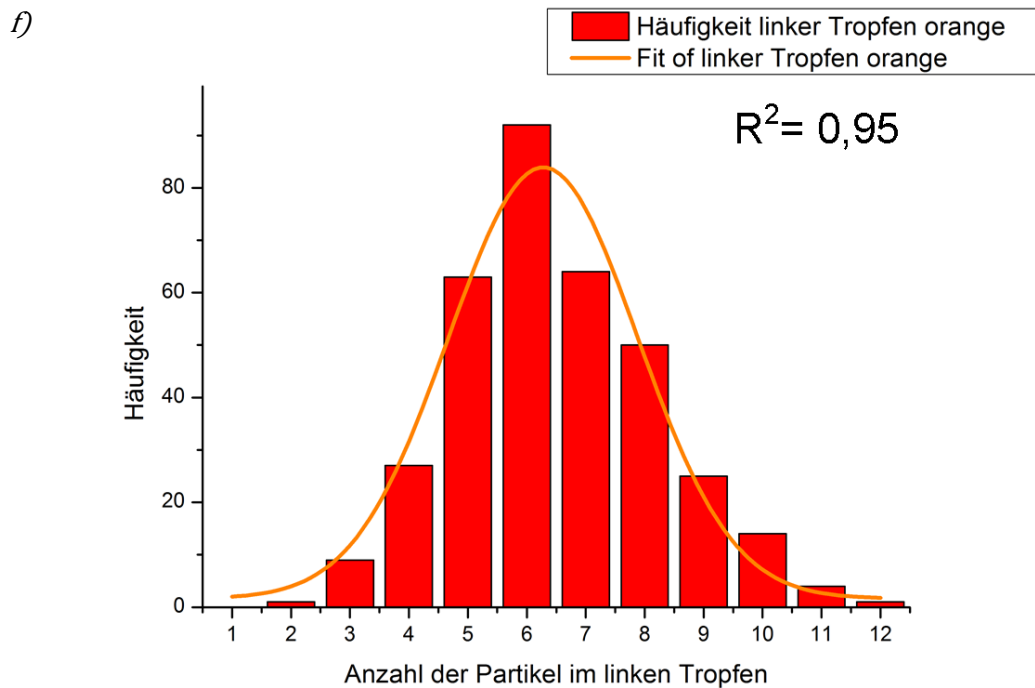
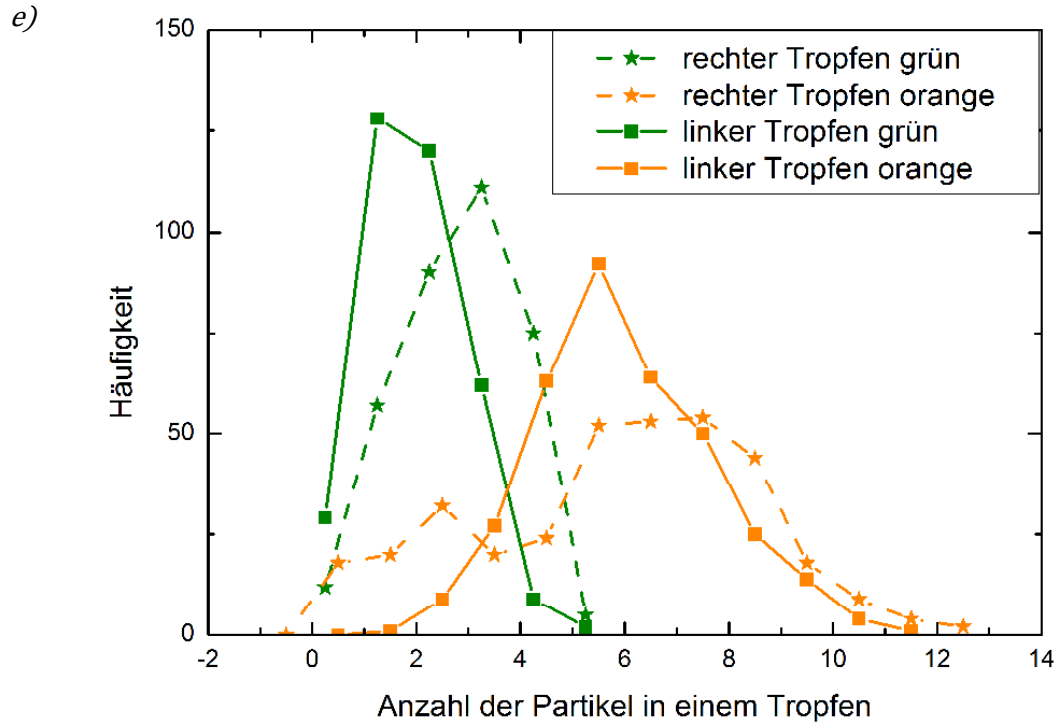


Abbildung 7-8: a) Verteilung zweier unterschiedlich fluoreszierender Partikelspezies eines automatisiert durchgeführten Teilungsexperimentes sowie b) eine exemplarische Kurvenanpassung durch eine Normalverteilung.

Wird also die Differenz der Mittelwerte als ein Maß für die Symmetrie angenommen, erhöht sich diese mit der Anzahl der Versuche. Allerdings ist ebenfalls zu bemerken, dass die absolute Anzahl der Partikel in den Experimenten nicht identisch war, sodass aufgrund dieser Konzeption ebenfalls eine Beeinflussung entstehen konnte. Es war ebenfalls zu beobachten, dass die Histogramme der Partikelhäufigkeiten mit zunehmender Anzahl an Versuchen exakter durch eine Normalverteilung approximiert werden konnten.

Im Allgemeinen wies das Bestimmtheitsmaß bei der Anpassung der Normalverteilung höhere Werte bei den automatisiert durchgeführten Experimenten auf, was sich in einem Verhältnis von $R^2 = 0,95$ gegenüber $R^2 = 0,65$ niederschlug. Zusätzlich trat eine asymmetrische Teilung des Tropfenvolumens auf, die das Ergebnis beeinflusst haben könnte. So ist zu vermuten, dass sich bei einer symmetrischeren Teilung des Tropfens die Mittelwerte der Normalverteilungen aneinander annähern und die Varianz abnimmt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit der Häufigkeit der Versuche zum einen die Symmetrie der Partikelverteilung zunimmt und zum anderen die Häufigkeitshistogramme exakter durch eine Normalverteilung angepasst werden können. Außerdem sollte eine symmetrischere Teilung des Tropfenvolumens zu einer Angleichung der Mittelwerte der Normalverteilungen und zu einer Verringerung der Varianz führen.

7.4 Sortierexperiment anhand fluoreszierender Beads

Das Konzept der Mikrochip-navigierten Zellsortierung beruht auf der parallelen Teilung von Flüssigkeitstropfen zur Separation enthaltener Partikel oder Zellen. Eine Sortierung beinhaltet ebenfalls einen Transport der Tropfen sowie ihre Verdünnung, um das Flüssigkeitsvolumen konstant zu halten. Außerdem ist eine homogene Verteilung der Partikel innerhalb des Tropfens notwendig. Sämtliche Operationen wurden anhand eines Sortierexperimentes demonstriert. Als Sortierplattform kam ein Electrowetting-Chip mit 456 ansteuerbaren Elektroden zum Einsatz (siehe Abschnitt 3). Aufgrund des Ausfalls einzelner Elektroden konnten jedoch nur einzelne Bereiche des Chips genutzt werden. Vor der Sortierung wurde der Chip mit Silikonöl über die Schlauchanschlüsse

im Deckel befüllt. Die partikelhaltigen Tropfen bestanden aus Propylencarbonat.

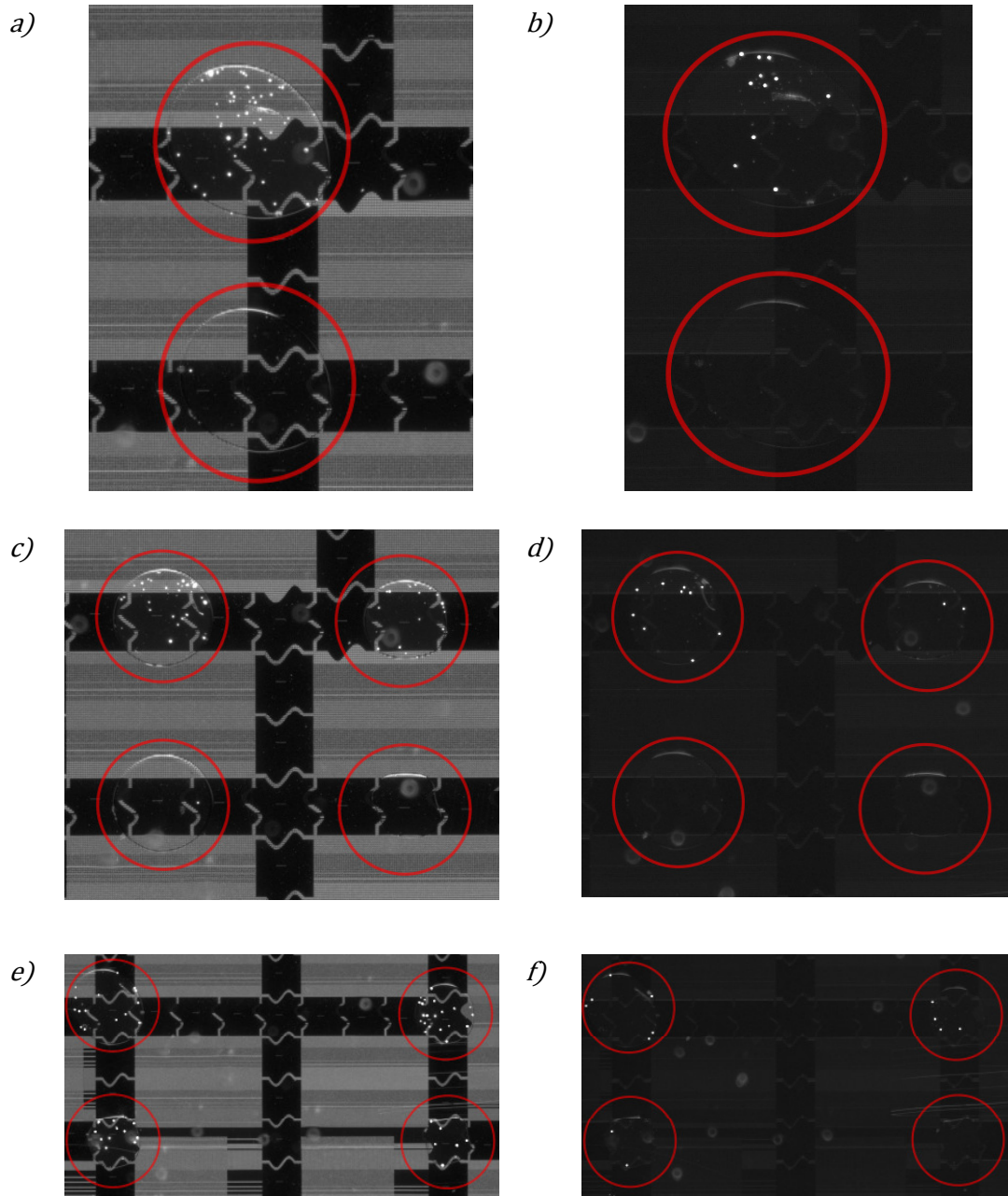


Abbildung 7-9: (a, b) Partikelverteilung innerhalb des Ausgangstropfens. (c, d) Verteilung der Partikel nach der ersten Tropfenteilung. (e, f). Aufteilung der Beads nach einem Verdünnungsschritt und einer zweiten Teilung.

Zur Lösung der fluoreszierenden Partikel in der Chemikalie kamen 0,01% des Polysorbat Tween zum Einsatz. Die Diskriminierung der Beads erfolgte mit Hilfe der Filtersätze 49 und 43 HE (siehe Tabelle 7.1). Zu Beginn des Versuchs wurden ein partikelhaltiger und ein Tropfen aus reinem Propylencarbonat generiert. Der Einsatz zweier unterschiedlicher Reservoirs war für dieses Vorgehen erstmals nötig. Nachdem die Beförderung der diskreten Flüssigkeitseinheiten in ihre Ausgangspositionen abgeschlossen war, wurden Aufnahmen mit den unterschiedlichen Filtersätzen erzeugt (Abb. 7-7 a, b).

Sie zeigen einen partikelhaltigen Tropfen am oberen und einen partikelfreien Tropfen am unteren Bildrand. Im Anschluss fand eine Teilung beider Tropfen statt (Abb. 7-7 c, d), und es folgte jeweils eine Vereinigung eines partikelhaltigen mit einem partikelfreien Tropfen. Eine weitere Teilung der verdünnten Tropfen sorgte schließlich für eine fortschreitende Sortierung (Abb. 7-7 e, f).

Die Partikelanzahl innerhalb eines Tropfens nach einem Teilungsschritt wird durch die Abbildung 7-8 wiedergegeben. Im Ausgangstropfen waren 50 Partikel mit Hilfe des Filters 49 und 11 Partikel durch den Filter 43 HE erkennbar. Die Abweichung der absoluten Partikelmenge nach der Teilung im Bezug zur Ausgangsmenge trat aufgrund mehrerer agglomerierter Beads auf, die als einzelner Bead erkannt wurden. Nach der ersten Teilung, teilten sich die gesamten Beads in ein Verhältnis von ca. 2:1 auf, und die zweite Teilung brachte Verhältnisse von ca. 1:1 und 2:1 hervor. Wie bereits in Abschnitt 3.7 gezeigt, scheint die Asymmetrie der Partikelverteilung aufgrund der nur einmaligen Durchführung des Experimentes entstanden zu sein. Es ist zu vermuten, dass durch die Erhöhung der Versuchsanzahl die Partikelverteilungen ebenfalls gegen ein Verhältnis von 1:1 streben würden. Außerdem scheint ebenfalls die asymmetrische Teilung des Tropfenvolumens einen Einfluss auf das Ergebnis zu haben. So beinhaltete der Tropfen mit dem größeren Volumen, bis auf eine Ausnahme, durchgehend eine höhere Partikelanzahl. Das Verhältnis zwischen den beiden Beadspezies innerhalb des Ausgangstropfens betrug ca. 5:1 zugunsten der mit dem Filter 49 erkennbaren Partikel. Nach der ersten Teilung ergaben sich zwischen den Spezies Verhältnisse von ca. 3:1 und 9:1. Nach der zweiten Teilung traten im ersten Tropfen Verhältnisse von 2:1 und 5:1 auf, während im zweiten Tropfen Werte von 5:1 und 6:0 auftraten. Unter der Annahme, dass sich beide

Partikelsorten in einem Verhältnis von 1:1 aufteilen, war allerdings ein konstantes Partikelverhältnis zu erwarten. Wiederum lassen sich die asymmetrische Tropfenteilung und die geringe Anzahl an Versuchen als Gründe für die Abweichung von der Ausgangshypothese nennen. Dennoch konnte bereits nach der zweiten Teilung ein erfolgreich sortierter Tropfen identifiziert werden, in dem lediglich nur noch eine Beadspezies vorhanden war. Dort betrug das Partikelverhältnis 6:0. Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine symmetrische Teilung des Tropfenvolumens nötig ist, um eine stabile Partikelverteilung während des gesamten Sortiervorganges aufrecht zu erhalten. Somit besteht die Notwendigkeit darin, die Electrowetting-Operationen robuster zu gestalten oder einen Sortieralgorithmus zu verwenden, der auf asymmetrische Teilungen reagiert. Asymmetrische Teilungen führen dennoch nicht zu einem grundsätzlichen Scheitern der Sortierung, sondern reduzieren lediglich die Vorhersagbarkeit des Verfahrens.

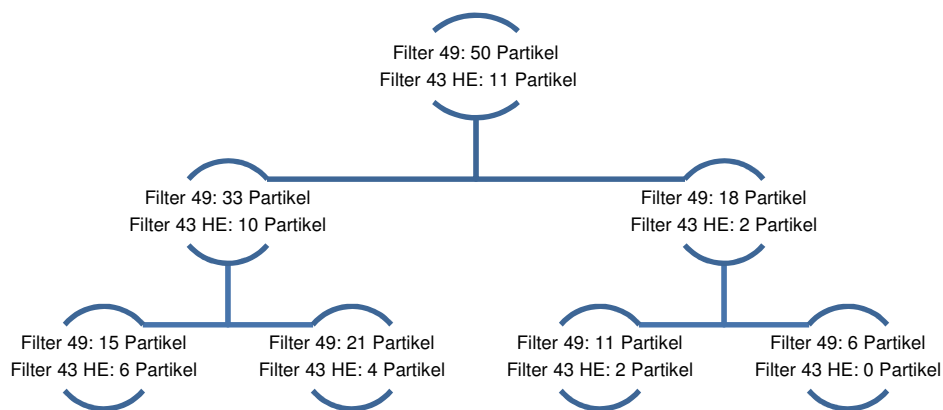


Abbildung 7-10: Verteilung zweier Partikelspezies während eines aus zwei Teilungen bestehenden Sortiervorganges. Aufgrund einer inhomogenen Partikelverteilung innerhalb des Ausgangstropfens verläuft die erste Teilung asymmetrisch. Ein Verdünnungsschritt und der Transport des Tropfens vor der zweiten Teilung ermöglichen eine homogenere Aufteilung der Partikel nach der zweiten Teilung.

7.5 Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe

Die Untersuchung der Fluoreszenz biologischer Zellen war von großer Relevanz. Vor allem eine ausreichende Fluoreszenzintensität musste gewährleistet sein, um einzelne biologische Zellen auf einem Bildfeld, welches annähernd der Chipfläche entsprach, detektieren zu können (ca. $2 \times 2 \text{ cm}^2$ bzw. $11,2 \times$ Vergrößerung). Als exemplarische Zellen wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC's) untersucht. Am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)(IFZ) der Universität Duisburg-Essen wurden die Zellen mit einer standardisierte Färbemethode angefärbt [73]. Dabei kamen die Farbstoffe 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) zum Einsatz. Eine Fluoreszenzuntersuchung der Zellen wurde an dem zuvor beschriebenen Messstand (siehe Abschnitt 4.2) durchgeführt. Die Untersuchungen fanden bei Vergrößerungen von $56 \times$ und $11,2 \times$ statt. Die verwendeten Filtersätze sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.

Tabelle 7.1: Standard Filtersätze

Bezeichnung	Anregung [nm]	Emission [nm]	Strahlteiler [nm]
38 HE	470/40	525/50	495
43 HE	550/25	605/70	570
49	365/60	445/50	395
50	640/30	690/50	660

Bei Verwendung der $56 \times$ Vergrößerung waren die Zellen auf allen Kanälen zu erkennen, wobei der Farbstoff DAPI die höchste Intensität aufwies (Abb. 7-9). Eine Optimierung der Fluoreszenz wurde allerdings nötig, da die Fluoreszenzintensität der meisten Farbstoffe bei einer Betrachtung von Flächen im Bereich von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ (ca. $11,2 \times$ Vergrößerung) nicht ausreichte, um die Zellen zu detektieren. Lediglich der Farbstoff DAPI ließ sich bei dieser Vergrößerung noch erkennen.

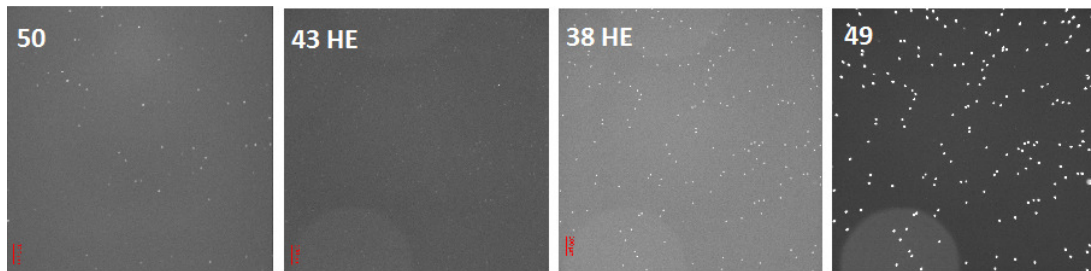


Abbildung 7-11: Aufnahme mit unterschiedlichen Farbstoffen angefärbter Zellen bei einer $56\times$ Vergrößerung.

Um die Fluoreszenz des FITC-Farbstoffes zu verstärken, wurde daher als zusätzliche Maßnahme eine Variation der Färbemethode (Faser Kit – FITC, Miltenyi) am IFZ durchgeführt. Wiederum fand die Untersuchung der Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop statt. Es zeigte sich, dass auch mit Hilfe der optimierten Methode die FITC markierten Zellen nur bis zu einem maximalen Bildfeld von $5,6 \times 5,6 \text{ mm}^2$ sichtbar waren (Abb. 7-10).

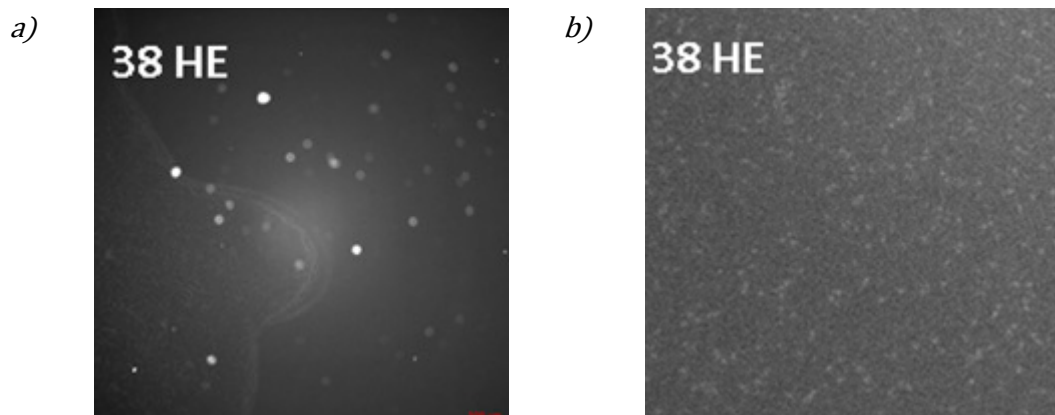


Abbildung 7-12: a) Aufnahme optimierter FITC gefärbter Zellen mit dem Fluoreszenzfilter 38 HE bei einem Sichtfeld von $5,6 \times 5,6 \text{ mm}^2$. b) Vergrößerter Bildausschnitt zur detaillierteren Darstellung der Zellen.

Neben den benannten Farbstoffen sollten daher weitere Farbstoffe und Filter die Fluoreszenzemission optimieren. So wurde beispielsweise das Derivat des Phycoerythrins PE-CF594 (F46_005) und der Farbstoff APCR_700 (F36_524_56) mit den in der folgenden Tabelle aufgeführten Filtersätzen unter-

sucht und mit den standardmäßig verwendeten Farbstoffen PE und Allophycocyanin (APC) verglichen. In diesem Fall fand die Detektion des Markers PE mit Hilfe des Filtersets 43 HE statt, und die Aufnahme des APCs kam durch die Verwendung des Filters 50 zustande (siehe Tabelle 7.1).

Tabelle 7.2: Erweiterte Filtersätze

Bezeichnung	Anregung [nm]	Emission [nm]	Strahlteiler [nm]
F46_005	470/40	525/50	495
F36_524_56	655/40	716/40	685/4

Die Intensität der Halogendampflampe war durchgehend maximal eingestellt, und die Belichtungszeit der Kamera betrug 190 ms. Die Einstellung des Zooms lag bei einer $11,2 \times$ Vergrößerung, wobei in diesem Bereich die Zellsortierung ablaufen sollte.

Der Farbstoff PE-CF594 erwies sich dabei als ein geeigneter Kandidat für die Durchführung folgender Sortierexperimente.

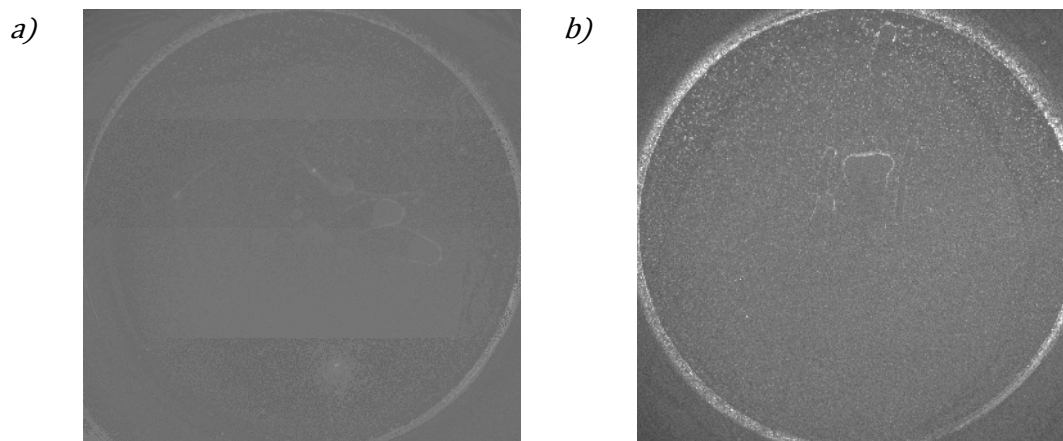


Abbildung 7-13: a) Untersuchung des Farbstoffs Phycoerythrin (PE) mit dem Filtersatz 43 HE. b) Untersuchung des Farbstoffs PE-CF594 mit dem Filtersatz F46_005.

Die Zellen waren auch bei einer $11,2 \times$ Vergrößerung erkennbar (Abb. 7-11 b), sodass der Farbstoff zusammen mit DAPI für die Sortierung von zwei unter-

schiedlichen Zellspezies genutzt werden könnte. Es fiel lediglich auf, dass die Zellen in der Peripherie des Bildfeldes eine höhere Intensität besaßen als die Objekte in der Mitte. Dies könnte mit der Ausleuchtung des gesamten Bereichs zu tun haben und müsste bei einer späteren Sortierung berücksichtigt werden. Die PE-gefärbten Zellen waren bei der genannten Vergrößerung für eine Zell-sortierung nicht ausreichend erkennbar (Abb. 7-11 a).

8 Zusammenfassung und Ausblick

Wie bereits dargelegt, weist die Mikrochip-navigierte Zellsortierung mehrere Vorteile gegenüber der Durchflusszytometrie auf. Daher war es das Ziel der Arbeit, die Grundlagen für eine Zellsortierung zu schaffen, die auf dem Prinzip eines digitalen mikrofluidischen Systems basiert. Zu Beginn wurde die Theorie des Electrowettings betrachtet und erklärt, wie sich elektrische Spannungen einsetzen lassen, um die Benetzung von Oberflächen durch Flüssigkeiten zu steuern. Die Erkenntnisse wurden daraufhin benutzt, um den Transport von Flüssigkeitstropfen in EWOD-Systemen zu beschreiben.

Der praktische Teil der Arbeit bestand in dem Aufbau und der Charakterisierung eines funktionsfähigen Electrowetting-Moduls, das zur Sortierung fluoreszierender Zellen genutzt werden kann. Vor diesem Hintergrund fand zunächst die Evaluation unterschiedlicher potentieller Messstände statt, wobei sich ein

Fluoreszenzmikroskop mit Zoom-Funktion und einem Sichtfeld von $2 \times 2 \text{ cm}^2$ als geeignet erwies. Der Aufbau des Mikrochips begann mit der Anfertigung des Layouts nach Vorgabe eines Sortieralgorithmus des Fachbereichs Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik der Universität Duisburg-Essen. Die Fertigung des Siliziumchips erfolgte nach einem standardisierten CMOS-Prozess in den Reinräumen des Fraunhofer IMS. Um aus dem unbehandelten Chip ein funktionsfähiges EWOD-Modul zu erzeugen, wurde zunächst eine dielektrische Tantalpentoxid-Schicht abgeschieden und ein Spacer aus dem Negativ-Fotolack SU-8 aufgetragen. Eine PTFE-Schicht diente der Hydrophobisierung der Oberfläche, und durch einen leitfähigen Glasdeckel wurde das EWOD-System abgeschlossen. Die Ansteuerung der Elektroden erfolgte über eine Software (Fraunhofer IMS), die es erlaubte, Fluidoperationen automatisiert ablaufen zu lassen und Funktionen des Mikroskops mit einzubeziehen.

Mit Hilfe des beschriebenen Aufbaus ließen sich Experimente bezüglich der Tropfengenerierung, der Tropfenteilung und der Tropfengeschwindigkeit durchführen. Zusätzlich fanden Teilungsexperimente mit fluoreszierenden Partikeln statt. Außerdem wurde ein erstes Sortierexperiment vorgestellt, in dem zwei unterschiedlich fluoreszierende Partikelspezies voneinander getrennt werden sollten. Der Versuch enthielt neben parallelen Teilungsschritten und Transportvorgängen ebenfalls Verdünnungsschritte. Die Tropfengenerierungsexperimente ergaben, dass das Volumen der generierten Tropfen mit der angelegten Spannung ansteigt. Ein ähnliches Verhalten fiel bei der Untersuchung der Geschwindigkeit auf. Auch in diesem Fall korrelierte eine Erhöhung der Spannung mit dem Anstieg der Geschwindigkeit. Der umgekehrte Zusammenhang ließ sich zwischen den Größen, „Tropfengeschwindigkeit“ und „Pulslänge“ beobachten. Die Symmetrie der Tropfenteilung wurde in Abhängigkeit von der Pulslänge untersucht. Als Resultat ergab sich ein optimaler Arbeitspunkt mit einer maximalen Symmetrie bei einer Pulslänge von 500 ms. Die Messungen der Partikelverteilungen nach einer Tropfenteilung zeigten, dass sich Partikel prinzipiell durch eine Tropfenteilung separieren lassen. Außerdem teilten sich die Partikel mit einer zunehmenden Anzahl an Versuchen annähernd in einem Verhältnis von 1:1 auf. Die Auftretshäufigkeiten ließen sich ebenfalls mit einer wachsenden Versuchsanzahl exakter durch eine Normalverteilung approximie-

ren. Dennoch waren teilweise asymmetrische Teilungen des Tropfenvolumens erkennbar, die einen Einfluss auf die Konstanz der Partikelverteilungen hatten. Um diesen Effekt zu minimieren, sollten die verwendeten Beschichtungen und Aufbautechniken im Fokus weiterer Untersuchungen stehen. So zeigten beispielsweise die Kontaktwinkelmessungen, dass es zwischen den verwendeten Verfahren zur Abscheidung der Teflonschicht deutliche Qualitätsunterschiede gibt und beispielsweise an dieser Stelle die hochwertigste Schicht gewählt werden sollte. Weiterhin sollte darauf verwiesen werden, dass die Zellen Pufferlösungen benötigen, die Hydrolyse verursachen und die Fluidoperationen beeinträchtigen können. Um dieses Problem zu lösen, sollte vor allem die dielektrische Schicht optimiert werden. Vorstellbar wäre es, unterschiedliche Dielektrika zu kombinieren und die Elektrolyse somit zu verringern.

Anhand der Untersuchungsergebnisse lässt sich aber auch schlussfolgern, dass eine Mikrochip-navigierte Zellsortierung realisierbar ist. So konnten geeignete Marker zur Färbung von Zellen identifiziert werden. Außerdem gelang es in Sortierversuchen, zwei fluoreszierende Partikelspezies voneinander zu separieren.

9 Literaturangaben

- [1] Ali Asgar S. Bhagat, Hansen Bow, Han Wei Hou, Swee Jin Tan, Jongyoon Han, Chwee Teck Lim: Microfluidics for cell separation. Medical & Biological Engineering & Computing (2010) 48, S. 999–1014
- [2] Rothe, G.: "Technische und methodische Grundlagen der Durchflussszytometrie". Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und Klinische Anwendungen der Durchflussszytometrie. Basel: Karger Verlag 2006
- [3] Mugele, F. u. Baret, J.-C.: Electrowetting. From basics to applications. Journal of Physics: Condensed Matter 17 (2005) 28, S. R705-R774
- [4] Geck, E.: Potenzialanalyse möglicher Anwendungsszenarien von EWOD-Mikrofluidik-Chips, Bachelorthesis, Fachgebebiet Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE), Universität Duisburg-Essen, 2015
- [5] Chang-An Chen, Chiun-Hsun Chen, Amir M. Ghaemmaghami and Shih-Kang Fan: Separation of Dendritic and T Cells Using Electrowetting and Dielectrophoresis. Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS) (2012) 7, S. 183–186
- [6] Cho, S. K., Zhao, Y. u. Kim, C.-J. C.: Concentration and binary separation of micro particles for droplet-based digital microfluidics. Lab on a chip 7 (2007) 4, S. 490–498

- [7] Shah, G. J., Ohta, A. T., Chiou, E. P.-Y., Wu, M. C. u. Kim, C.-J. C. J.: EWOD-driven droplet microfluidic device integrated with optoelectronic tweezers as an automated platform for cellular isolation and analysis. *Lab on a chip* 9 (2009) 12, S. 1732–1739
- [8] Shah, G. J., Veale, J. L., Korin, Y., Reed, E. F., Gritsch, H. A. u. Kim, C.-J. C.: Specific binding and magnetic concentration of CD8+ T-lymphocytes on electrowetting-on-dielectric platform. *Biomicrofluidics* 4 (2010) 4, S. 44106
- [9] Shah, G. J. u. Chang-Jin Kim: Meniscus-Assisted High-Efficiency Magnetic Collection and Separation for EWOD Droplet Microfluidics. *Journal of Microelectromechanical Systems* 18 (2009) 2, S. 363–375
- [10] Shah, G. J. u. Kim, C.-J. C.: Fluidic conduits for highly efficient purification of target species in EWOD-driven droplet microfluidics. *Lab on a chip* 9 (2009) 16, S. 2402–2405
- [11] Wang, Y., Zhao, Y. u. Cho, S. K.: Efficient in-droplet separation of magnetic particles for digital microfluidics. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (2007) 10, S. 2148–2156
- [12] Zhao, Y., Yi, U.-C. u. Cho, S. K.: Microparticle Concentration and Separation by Traveling-Wave Dielectrophoresis (twDEP) for Digital Microfluidics. *Journal of Microelectromechanical Systems* 16 (2007) 6, S. 1472–1481
- [13] Shields, C. W., Reyes, C. D. u. López, G. P.: Microfluidic cell sorting: a review of the advances in the separation of cells from debulking to rare cell isolation. *Lab on a chip* 15 (2015) 5, S. 1230–1249
- [14] Kazunori Takahashi, Akihiro Hattori, Ikurou Suzuki, Takanori Ichiki: Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time microscopic image processing. *Journal of Nanobiotechnology* 2 (2004)
- [15] Yao, B., Luo, G.-a., Feng, X., Wang, W., Chen, L.-x. u. Wang, Y.-m.: A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Lab on a chip* 4 (2004) 6, S. 603–607
- [16] Guo, F., Ji, X.-H., Liu, K., He, R.-X., Zhao, L.-B., Guo, Z.-X., Liu, W., Guo, S.-S. u. Zhao, X.-Z.: Droplet electric separator microfluidic device for cell sorting. *Applied Physics Letters* 96 (2010) 19, S. 193701
- [17] Lenshof, A. u. Laurell, T.: Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society reviews* 39 (2010) 3, S. 1203–1217

-
- [18] Wang, L., Flanagan, L. A., Monuki, E., Jeon, N. L. u. Lee, A. P.: Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry. *Lab on a chip* 7 (2007) 9, S. 1114–1120
- [19] Baret, J.-C., Miller, O. J., Taly, V., Ryckelynck, M., El-Harrak, A., Frenz, L., Rick, C., Samuels, M. L., Hutchison, J. B., Agresti, J. J., Link, D. R., Weitz, D. A. u. Griffiths, A. D.: Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab on a chip* 9 (2009) 13, S. 1850–1858
- [20] Fu, A. Y., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F. H. u. Stephen R. Quake: A micro-fabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nature Biotechnology* 17 (1999) 11, S. 1109–1111
- [21] Jakobsson, O., Grenvall, C., Nordin, M., Evander, M. u. Laurell, T.: Acoustic actuated fluorescence activated sorting of microparticles. *Lab on a chip* 14 (2014) 11, S. 1943–1950
- [22] Wu, T.-H., Chen, Y., Park, S.-Y., Hong, J., Teslaa, T., Zhong, J. F., Di Carlo, D., Teitell, M. A. u. Chiou, P.-Y.: Pulsed laser triggered high speed microfluidic fluorescence activated cell sorter. *Lab on a chip* 12 (2012) 7, S. 1378–1383
- [23] Chen, P., Feng, X., Hu, R., Sun, J., Du, W. u. Liu, B.-F.: Hydrodynamic gating valve for microfluidic fluorescence-activated cell sorting. *Analytica chimica acta* 663 (2010) 1, S. 1–6
- [24] Hoshino, K., Huang, Y.-Y., Lane, N., Huebschman, M., Uhr, J. W., Frenkel, E. P. u. Zhang, X.: Microchip-based immunomagnetic detection of circulating tumor cells. *Lab on a Chip* 11 (2011) 20, S. 3449
- [25] Shields, C. W., Johnson, L. M., Gao, L. u. López, G. P.: Elastomeric negative acoustic contrast particles for capture, acoustophoretic transport, and confinement of cells in microfluidic systems. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 30 (2014) 14, S. 3923–3927
- [26] Hu, X., Bessette, P. H., Qian, J., Meinhart, C. D., Daugherty, P. S. u. Soh, H. T.: Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 44, S. 15757–15761

- [27] Petersson, F., Nilsson, A., Holm, C., Jonsson, H. u. Laurell, T.: Separation of lipids from blood utilizing ultrasonic standing waves in microfluidic channels. *The Analyst* 129 (2004) 10, S. 938–943
- [28] Kim, U., Shu, C.-W., Dane, K. Y., Daugherty, P. S., Wang, J. Y. J. u. Soh, H. T.: Selection of mammalian cells based on their cell-cycle phase using dielectrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007) 52, S. 20708–20712
- [29] Han, K.-H. u. Frazier, A. B.: Paramagnetic capture mode magnetophoretic microseparator for high efficiency blood cell separations. *Lab on a chip* 6 (2006) 2, S. 265–273
- [30] Hoi, S.-K., Udalagama, C., Sow, C.-H. u. Bettiol, A. A.: Microfluidic sorting system based on optical force switching. *MOEMS-MEMS. SPIE Proceedings. SPIE* 2010
- [31] Huang, L. R., Cox, E. C., Austin, R. H. u. Sturm, J. C.: Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science (New York, N.Y.)* 304 (2004) 5673, S. 987–990
- [32] Lee, C.-H., Bose, S., van Vliet, K. J., Karp, J. M. u. Karnik, R.: Examining the lateral displacement of HL60 cells rolling on asymmetric P-selectin patterns. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27 (2011) 1, S. 240–249
- [33] Hyun KA, Lee TY, Jung HI.: Negative enrichment of circulating tumor cells using a geometrically activated surface interaction chip. *Analytical Chemistry* 85 (2013) 9, S. 4439–4445
- [34] Xu, Y., Phillips, J. A., Yan, J., Li, Q., Fan, Z. H. u. Tan, W.: Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells. *Analytical Chemistry* 81 (2009) 17, S. 7436–7442
- [35] Shen, H.-H., Fan, S.-K., Kim, C.-J. u. Yao, D.-J.: EWOD microfluidic systems for biomedical applications. *Microfluidics and Nanofluidics* 16 (2014) 5, S. 965–987
- [36] Hsien-Hua Shen, Tsung-Yao Su, Yi-Ju Liu, Hwan-You Chang and Da-Jeng Yao: Single-Nucleotide Polymorphism Detection Based on a Temperature-Controllable Electrowetting on Dielectrics Digital Microfluidic Systems. *Sensors and Materials* 25 (2013) 9, S. 643–651

-
- [37] Hua, Z., Rouse, J. L., Eckhardt, A. E., Srinivasan, V., Pamula, V. K., Schell, W. A., Benton, J. L., Mitchell, T. G. u. Pollack, M. G.: Multiplexed real-time polymerase chain reaction on a digital microfluidic platform. *Analytical Chemistry* 82 (2010) 6, S. 2310–2316
- [38] Liu, Y.-J., Yao, D.-J., Lin, H.-C., Chang, W.-Y. u. Chang, H.-Y.: DNA ligation of ultramicro volume using an EWOD microfluidic system with coplanar electrodes. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 18 (2008) 4, S. 45017
- [39] Boles, D. J., Benton, J. L., Siew, G. J., Levy, M. H., Thwar, P. K., Sandahl, M. A., Rouse, J. L., Perkins, L. C., Sudarsan, A. P., Jalili, R., Pamula, V. K., Srinivasan, V., Fair, R. B., Griffin, P. B., Eckhardt, A. E. u. Pollack, M. G.: Droplet-based pyrosequencing using digital microfluidics. *Analytical Chemistry* 83 (2011) 22, S. 8439–8447
- [40] Jebrail, M. J. u. Wheeler, A. R.: Digital microfluidic method for protein extraction by precipitation. *Analytical Chemistry* 81 (2009) 1, S. 330–335
- [41] Miller, E. M., Ng, A. H. C., Uddayasankar, U. u. Wheeler, A. R.: A digital microfluidic approach to heterogeneous immunoassays. *Analytical and bioanalytical chemistry* 399 (2011) 1, S. 337–345
- [42] Witters, D., Vergauwe, N., Vermeir, S., Ceyssens, F., Liekens, S., Puers, R. u. Lammertyn, J.: Biofunctionalization of electrowetting-on-dielectric digital microfluidic chips for miniaturized cell-based applications. *Lab on a chip* 11 (2011) 16, S. 2790–2794
- [43] Barbulovic-Nad, I., Au, S. H. u. Wheeler, A. R.: A microfluidic platform for complete mammalian cell culture. *Lab on a chip* 10 (2010) 12, S. 1536–1542
- [44] Noha A. Mousa, Mais J. Jebrail, Hao Yang, Mohamed Abdelgawad: Droplet-Scale Estrogen Assays in Breast Tissue, Blood, and Serum. *Science Translational Medicine* 1 (2009) 1ra2
- [45] Mortimer, Charles E., Müller Ulrich: *Chemie. Das Basiswissen der Chemie*. Thieme 2010
- [46] Erni, D.: *Theoretische Elektrotechnik 1 (TET1). Elektrostatik*, Universität Duisburg-Essen Vorlesung Theoretische Elektrotechnik 1. Duisburg

- [47] Wolff, I.: Maxwellsche Theorie. Grundlagen und Anwendungen, 1 Elektrostatik. Aachen: Verlagsbuchhandlung Dr. Wolff 2005
- [48] Atkins, W. P. u. Paula, J. de: Physikalische Chemie. Weinheim, Deutschland: WILEY-VCH 2013
- [49] Marchand J., Weijs J. H., Snoeijer J. H. and Andreotti B.: Why is surface tension a force parallel to the interface? American Journal of Physics 79 (2011)
- [50] Kuhlmann, H.: Strömungsmechanik. Pearson Studium 2007
- [51] Berthier, J.: Micro-Drops and Digital Microfluidics. Elsevier 2013
- [52] Herberth, U.: Fluid manipulation by Means of Electrowetting-On-Dielectrics, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg Dissertation. Freiburg 2006
- [53] Jones, T. B.: An electromechanical interpretation of electrowetting. Journal of Micromechanics and Microengineering 15 (2005) 6, S. 1184–1187
- [54] Mugele, F.: Fundamental challenges in electrowetting. From equilibrium shapes to contact angle saturation and drop dynamics. Soft Matter 5 (2009) 18, S. 3377–3388
- [55] Cho Sung Kwon, Moon Hyejin u. Kim Chang-Jin: Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits. Journal of Microelectromechanical Systems 12 (2003) 1, S. 70–80
- [56] Schreiber F., Kahnert S., Goehlich A., Greifendorf D., Bartels F., Janzyk U., Lennartz K., Kirstein U., Rennings A., Küppers R. u. Erni D.: Mikrofluidik-Chip-Architekturen für eine Zell-Sortieranlage basierend auf der Elektrowetting-Technologie. tm - Technisches Messen 83 (2016) 5
- [57] Schreiber F., Kahnert S., Goehlich A., Greifendorf D., Bartels F., Janzyk U., Lennartz K., Kirstein U., Rennings A., Küppers R., and Erni D.: Mikrofluidik-Chip-Architekturen für eine Zell-Sortieranlage basierend auf der Elektrowetting-Technologie. IEEE Workshop Medizinische Messtechnik 2015, Instrumentation and Measurement Chapter IEEE Germany Section 4 (2015), S. 27–28

-
- [58] Ecken, S. von der: Entwicklung einer Matrix-Ansteuerung für eine Elektrobenetzungs-Chipplattform zur Zellsortierung, Karlsruher Institut für Technologie Diplomarbeit. Karlsruhe 2012
- [59] Neukammer J., Gohlke C., Krämer B. and Roos M.: Concept for the Traceability of Fluorescence (Beads) in Flow Cytometry: Exploiting Saturation and Microscopic Single Molecule Bleaching. *Journal of Fluorescence* 15 (2005) 3, S. 433–441
- [60] Cincinnati Children's Hospital Medical Center: Fluorochrome Brightness Chart. www.cincinnatichildrens.org/research/cores/flow-cytometry/resources
- [61] Pawley, J. B.: *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Springer Science+Business Media 2006
- [62] Mugele F., Staicu A., Bakker R., van den Ende D.: Capillary Stokes drift: a new driving mechanism for mixing in AC-electrowetting. *Lab Chip* 11 (2011), S. 2011–2016
- [63] Dhindsa M., Heikenfeld J. Weekamp W., Kuiper S.: Electrowetting without Electrolysis on Self-Healing Dielectrics. *Langmuir* 27 (2011) 9, S. 5665–5670
- [64] Kedzierski J., Berry S. and Abedian B.: New Generation of Digital Microfluidic Devices. *Journal of Microelectromechanical Systems* 18 (2009) 4, S. 845–851
- [65] Lerma Arce C., Witters D., Puers R., Lammertyn J., Bienstman P: Silicon photonic sensors incorporated in a digital microfluidic system. *Analytical and bioanalytical chemistry* (2012)
- [66] Nemani V. K., Moodie, L. K., Brennick B. J., Su A., Gimi B.: In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility. *Material Science and Engineering* 33 (2013) 7, S. 4453–4459
- [67] Limb, S. J., Labelle, C. B., Gleason, K. K., Edell, D. J. u. Gleason, E. F.: Growth of fluorocarbon polymer thin films with high CF₂ fractions and low dangling bond concentrations by thermal chemical vapor deposition. *Applied Physics Letters* 68 (1996) 20, S. 2810

- [68] Gambogi R. J., Cho D. L., Yasuda H., Blum F. D.: Characterization of plasma polymerized hydrocarbons using CP-MAS ^{13}C -NMR. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 29 (1991) 12, S. 1801–1805
- [69] Yasuda H., H. T.: Some aspects of plasma polymerization investigated by pulsed R.F. discharge. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* 15 (1977), S. 81–87
- [70] Wróbel, A. M.: Aging Process in Plasma-Polymerized Organosilicon Thin Films. *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 22 (2006) 8, S. 1089–1100
- [71] Peter Kurzweil: *Chemie. Grundlagen, Aufbauwissen, Anwendungen und Experimente*. Wiebaden: Springer Vieweg
- [72] Kahnert S., Goehlich A., Greifendorf D., Vogt H., Lennartz K., Kirstein U., Göllner B., Michelsen U., Bartels F., Schreiber F., Rennings A., Erni D.: Development of a microchip based cell sorting device. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik* 59 (2014) S1, S. 137–139
- [73] Przekopowicz, M. u. Lennartz, K.: *Cell staining of PBMC's. persönliche Mitteilung*. Essen 2016

Veröffentlichungen

- [1] B. Göllner, D. Kerkhoff, U. Michelsen, M. Padberg, F. Schreiber, and D. Erni, "Design optimization of an electrowetting cell sorter chip platform," *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, vol. 57, no. SL-1, pp. 978-981, Sept. 2012
- [2] B. Göllner, D. Kerkhoff, U. Michelsen, M. Padberg, F. Schreiber, and D. Erni, "Design optimization of an electrowetting cell sorter chip platform," *BMT 2012 - 46. DGBMT Jahrestagung, Deutsche Gesellschaft für Biomedizinische Technik*, Sept. 16-19, Jena, Germany, Track G: Innovative Methods in Tissue Engineering & Regenerative Medicine, Track G, pp. 59, 2012.

-
- [3] F. Schreiber, A. Rennings, and D. Erni, "Optimierung von Chip-Architekturen effizienter Zellsorter basierend auf dem Elektrowetting-Verfahren," 4. Mikrosystemtechnik-Kongress 2013 (MST 2013), VDE und Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Oct. 14-16, Eurogress, Aachen, Germany, paper 1.21, pp. 413-416, 2013.
 - [4] Uwe Kirstein, Klaus Lennartz, "Innovation für Zellsortierungen – Neues Verfahren für gleichzeitigen Personen- und Produktschutz", UNIKATE, Nr. 46, (www.uni-due.de/unikate/), pp. 48-58, March 2014.
 - [5] F. Schreiber, S. Kahnert, A. Goehlich, D. Greifendorf, F. Bartels, U. Michelsen, K. Lennartz, U. Kirstein, A. Rennings, R. Küppers, and D. Erni, "An efficient on-chip electrowetting cell sorter architecture based on smart diffusion," Microfluidics 2014, EMBL Conference, July 23-25, EMBL Heidelberg, Germany, paper #133, pp. 155, 2014.
 - [6] S. Kahnert, K. Lennartz, U. Kirstein, F. Schreiber, D. Erni, A. Goehlich, H. Vogt, D. Greifendorf, B. Göllner, F. Bartels, A. Rennings, and U. Michelsen, "Development of a microchip based cell sorting device," BMT 2014 – 48th DGBMT Annual Conference, Deutsche Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Oct. 8-10, Hannover, Germany, Track B: 'Biosensors and Bioanalytics', Paper 4056, 2014.
 - [7] S. Kahnert, A. Goehlich, D. Greifendorf, H. Vogt, K. Lennartz, U. Kirstein, B. Göllner, U. Michelsen, F. Bartels, F. Schreiber, A. Rennings, and D. Erni, "Development of a microchip based cell sorting device," Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik, vol. 59, no. S-1, pp. S137-S139, (DOI: 10.1515/bmt-2014-5001), Oct. 2014.
 - [8] F. Schreiber, S. Kahnert, A. Goehlich, D. Greifendorf, F. Bartels, U. Janzyk, K. Lennartz, U. Kirstein, A. Rennings, R. Küppers, and D. Erni, "Mikrofluidik-Chip-Architekturen für eine Zell-Sortieranlage basierend auf der Elektrowetting-Technologie," IEEE Workshop Medizinische Messtechnik 2015, Instrumentation and Measurement Chapter IEEE Germany Section, April 17, University of Applied Sciences Ruhr-West (HRW), Muelheim an der Ruhr, Germany, 2015.

- [9] S. Kahnert, F. Schreiber, A. Goehlich, D. Erni, D. Greifendorf, K. Lennartz, U. Kirstein, F. Bartels, U. Janzyk, A. Rennings, R. Küppers, and H. Vogt, "Entwicklung einer Mikrochip navigierten Zellsortieranlage," 6. Mikrosystemtechnik-Kongress 2015 (MST 2015), VDE and Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Oct. 26-28, Stadthalle Karlsruhe, Karlsruhe, Germany, 2015.
- [10] Schreiber F, Kahnert S, Goehlich A, Greifendorf D, Bartels F, Janzyk U, Lennartz K, Kirstein U, Rennings A, Küppers R. u. Erni D.: Mikrofluidik-Chip-Architekturen für eine Zell-Sortieranlage basierend auf der Elektrowetting-Technologie. *tm - Technisches Messen* 83 (2016) 5.

Patente

- [11] T. van den Boom, B. Hosticka, W. Brockherde, B. Bechem, D. Erni, U. Kirstein, K. Lennartz, "Verfahren zum Behandeln einer Population von in Flüssigkeitströpfchen suspendierten Objekten aus Ziel- und Restpartikeln sowie Vorrichtung zum Durchführen dieses Verfahrens", Anmelder: Fraunhofer-Gesellschaft, Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme (FhG-IMS), Universität Duisburg-Essen, Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE), Universitätsklinikum Essen, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) (IFZ), publication date Nov. 18, 2010, (German patent application, Nr. DE 10 2009 021 614 A1).

- [12] U. Kirstein, K. Lennartz, T. van den Boom, B. Hosticka, W. Brockherde, B. Bechem, D. Erni, "Method for treating a population of objects suspended in fluid droplets comprising a target and residual particle, and device for performing the waiting loop of said method", Universität Duisburg-Essen, Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE), Universitätsklinikum Essen, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) (IFZ), Fraunhofer-Gesellschaft, Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme (FhG-IMS), November 18, 2010, (World patent Nr. WO 2010/130459 A2).

Abschlussarbeiten

- [13] Moritz Padberg, Entwicklung, Aufbau und Optimierung eines Zellsortiersystems zur Umsetzung mikrofluidischer Operationen basierend auf der Funktionsweise des Electrowettings. Bachelor thesis (Studiengang Mikrotechnik), Physikalische Technik, Westfälische Hochschule Gelsenkirchen, 2012.
- [14] Sebastian Kerkhoff, Entwicklung und Aufbau eines Lab-on-a-Chip-Systems zur Umsetzung mikrofluidischer Operationen basierend auf der Funktionsweise des Electrowettings. Bachelorthesis, (Maschinenbau), Technische Universität Dortmund, 2012.
- [15] Sebastian Kerkhoff, Entwicklung und Aufbau eines Lab-on-a-Chip-Systems zur Umsetzung mikrofluidischer Operationen basierend auf der Funktionsweise des Electrowettings. Bachelorthesis, (Maschinenbau), Technische Universität Dortmund, 2012.

- [16] Michael Heinrich, Intelligente Hochgeschwindigkeits-Zellsortierung in elektronisch getakteten Mikrofluidik-Chips. Bachelorthesis, (Studiengang Elektrotechnik), Fachgebiet Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE), Universität Duisburg-Essen, May 19, 2014.
- [17] Michael Heinrich, Intelligente Hochgeschwindigkeits-Zellsortierung in elektronisch getakteten Mikrofluidik-Chips. Bachelorthesis, (Studiengang Elektrotechnik), Fachgebiet Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE), Universität Duisburg-Essen, May 19, 2014.
- [18] Geck, E.: Potenzialanalyse möglicher Anwendungsszenarien von EWOD-Mikrofluidik-Chips, Bachelorthesis, Fachgebebiet Allgemeine und Theoretische Elektrotechnik (ATE), Universität Duisburg-Essen, 2015.

Danksagung

Mein Dank gilt Allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Holger Vogt für die Schaffung hervorragender Rahmenbedingungen für Forschungsarbeiten und seine engagierte Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Erni für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Für die fachliche Begleitung und stetige Weiterentwicklung der Arbeit danke ich meinem Gruppenleiter Dr. Andreas Goehlich.

Meinen Kollegen am Fraunhofer Institut für Mikroelektronische Schaltungen und Systeme (IMS) danke ich für die fachlichen Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Hervorzuheben sind dabei Dr. Dieter Greifendorf, Andreas Schmidt und Levent Gözüyasli, die die Ansteuerung des Mikrochips entwickelten, sowie Martin Stühlmeyer, Andreas Jupe und Dorothee Dietz für ihre Tätigkeit im MST-Labor.

Unter besonderer Berücksichtigung von Herrn Udo Janzyk, Herrn Klaus Lennartz und Herrn Fedor Schreiber gilt mein Dank ebenfalls sämtlichen Projektpartnern für die konstruktive Zusammenarbeit während des gesamten Forschungsprojektes.

Ein Dank geht auch an meine Familie und meine Freunde, die immer für den nötigen Rückhalt gesorgt haben.